

AE

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-509082

(P2002-509082A)

(43) 公表日 平成14年3月26日 (2002.3.26)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
C 0 7 K 1/107		C 0 7 K 1/107	4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00		A 6 1 K 47/48	4 B 0 6 4
	47/48	A 6 1 P 3/04	4 C 0 7 6
A 6 1 P 3/04			4 C 0 8 4
	3/10		4 H 0 4 5
		5/24	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 119 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-535659 (P2000-535659)
 (86) (22) 出願日 平成11年3月9日 (1999.3.9)
 (85) 翻訳文提出日 平成12年9月11日 (2000.9.11)
 (86) 国際出願番号 P C T / D K 9 9 / 0 0 1 1 8
 (87) 国際公開番号 W O 9 9 / 4 6 2 8 3
 (87) 国際公開日 平成11年9月16日 (1999.9.16)
 (31) 優先権主張番号 0 3 1 7 / 9 8
 (32) 優先日 平成10年3月9日 (1998.3.9)
 (33) 優先権主張国 デンマーク (DK)

(71) 出願人 ジーランド ファーマシューティカルズ
 アクティーゼルスカプ
 デンマーク国, デーヨー-2970 ヘルショ
 ルム, アゲルン アレ 3, イノパティオ
 ンシュセツト
 (72) 発明者 ラルセン, ビャルネ ドゥエ
 デンマーク国, デーヨー-2700 プレンシ
 エイ, 1. テーホー., アリルトスガルト
 5
 (74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

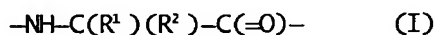
(54) 【発明の名称】 酵素加水分解に対する傾向が減少した薬理学的に活性なペプチド複合体

(57) 【要約】

本発明は、薬理学的に活性なペプチド配列(X)と、Xに共有結合した4~20アミノ酸残基の安定化ペプチド配列(Z)とを含んでなる酵素切断に対する傾向が減少した薬理学的に活性なペプチド複合体に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 XおよびZを含んでなる酵素的切断に対する傾向が減少した薬理学的に活性なペプチド複合体またはその塩、ここでXは薬理学的に活性なペプチド配列であり、そしてZはXに共有結合した4～20アミノ酸単位の安定化ペプチド配列であり、ここで前記安定化ペプチド配列Z中の各アミノ酸単位はAla、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Met、Orn、および一般式Iのアミノ酸単位から成る群より選択される：



式中、 R^1 および R^2 は水素、 C_{1-6} -アルキル、フェニル、およびフェニル-メチルから成る群より選択され、ここで C_{1-6} -アルキルはハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1～3個の置換基で置換されていてもよく、そしてフェニルおよびフェニル-メチルは C_{1-6} -アルキル、 C_{2-6} -アルケニル、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1～3個の置換基で置換されていてもよい、あるいは R_1 および R_2 はそれらが結合する炭素原子と一緒にシクロペンチル、シクロヘキシル、またはシクロヘプチル環、例えば、2,4-ジアミノブタン酸および2,3-ジアミノプロパン酸を形成し；そして前記ペプチド複合体の半減期と対応する薬理学的に活性なペプチド配列Xの半減期との間の比は、約50mMのリン酸塩緩衝液中で約pH7.4、約37℃において、あるいは血漿または血清中でカルボキシペプチダーゼAまたはロイシンアミノペプチダーゼで処理するとき、少なくとも約2、好ましくは少なくとも約3、例えば、少なくとも約5、より好ましくは少なくとも約7、例えば、少なくとも約9、例えば、少なくとも約10であるか、あるいは前記薬理学的に活性なペプチドXが経口的に吸収されないとき、前記複合体は吸収され、ただし前記薬理学的に活性なペプチド複合体は、

H-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu-(Lys-Glu)₃-OH、

H-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu-(Glu)₆-OH、

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Glu)₆-OH、および

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Lys)₆-OH

から選択されない。

【請求項2】 ZがXのC末端のカルボニル官能基においてXに共有結合している、請求項1に記載のペプチド複合体。

【請求項3】 ZがXのN末端の窒素原子に共有結合している、請求項1に記載のペプチド複合体。

【請求項4】 第1配列(Z)がXのC末端のカルボニル官能基においてXに共有結合しており、そして第2配列(Z)がXのN末端の窒素原子に共有結合している、請求項1に記載のペプチド複合体。

【請求項5】 Zがリシン、アルギニンまたはヒスチジン残基の側鎖上の窒素原子に共有結合しているか、あるいはXのグルタミン酸またはアスパラギン酸の側鎖上のカルボニル官能基に共有結合している、請求項1に記載のペプチド複合体。

【請求項6】 Zが4~15、好ましくは4~10、より好ましくは4~7、例えば、6アミノ酸単位から成る、請求項1~5のいずれか一項に記載のペプチド複合体。

【請求項7】 Z中の各アミノ酸単位がSer、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Orn、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロパン酸およびMetから成る群より独立して選択される、請求項5または6に記載のペプチド複合体。

【請求項8】 Z中の各アミノ酸単位がGlu、LysおよびMetから成る群より選択される、請求項7に記載のペプチド複合体。

【請求項9】 Zが少なくとも1つのアミノ酸単位、好ましくは少なくとも2つのLysアミノ酸単位、例えば、少なくとも3つのLysアミノ酸単位、例えば、少なくとも4つのLysアミノ酸単位、より好ましくは少なくとも5つのLysアミノ酸単位、例えば、6つのLysアミノ酸単位を含んでなる、請求項5~8のいずれか一項に記載のペプチド複合体。

【請求項10】 Zが(Lys)_nであり、ここでnは4~15の範囲、好ましくは4~10の範囲、例えば、4~8の範囲、例えば4~6の範囲の整数である、請求項9に記載のペプチド複合体。

【請求項11】 ZがLys₄、Lys₅またはLys₆である、請求項9に記載のペプチド複合体。

【請求項12】 ZがLys₆である、請求項11に記載のペプチド複合体。

【請求項13】 Zが(Lys-Xaa)_mまたは(Xaa-Lys)_mであり、ここでmは2~7の範囲の整数であり、そして各XaaはSer、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Arg、His、Orn、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロパン酸およびMetから成る群より独立して選択される、請求項5~9のいずれか一項に記載のペプチド複合体。

【請求項14】 Zが(Lys-Xaa)₃または(Xaa-Lys)₃であり、ここで各XaaはSer、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Arg、His、Orn、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロパン酸およびMetから成る群より独立して選択される、請求項13に記載のペプチド複合体。

【請求項15】 Zが(Lys-Glu)₃または(Glu-Lys)₃である、請求項15に記載のペプチド複合体。

【請求項16】 ZがLys_p-Xaa_qまたはXaa_p-Lys_qであり、ここでpおよびqは1~14の範囲の整数であり、ただしp+qは3~15の範囲であり、そして各XaaはSer、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Arg、His、Orn、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロパン酸およびMetから成る群より独立して選択される、請求項5~9のいずれか一項に記載のペプチド複合体。

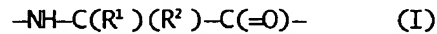
【請求項17】 ZがLys₃-Xaa₃またはXaa₃-Lys₃であり、ここで各XaaはSer、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Arg、His、Orn、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロパン酸およびMetから成る群より独立して選択される、請求項16に記載のペプチド複合体。

【請求項18】 ZがLys₃-Glu₃またはGlu₃-Lys₃である、請求項17に記載のペプチド複合体。

【請求項19】 ZがLys-Lys-Lys-Lys、Xaa-Lys-Lys-Lys、Lys-Xaa-Lys-Lys、Lys-Lys-Xaa-Lys、Lys-Lys-Lys-Xaa、Xaa-Xaa-Lys-Lys、Xaa-Lys-Xaa-Lys、Xaa-Lys-Lys-Xaa、Lys-Xaa-Xaa-Lys、Lys-Xaa-Lys-Xaa、Lys-Lys-Xaa-Xaa、Xaa-Xaa-Lys、Xaa-Xaa-Lys-Xaa、Xaa-Lys-Xaa-Xaa、Lys-Xaa-Xaa-Xaa、Xaa-Xaa-Xaa-Lys、Lys-Lys-Lys-Lys-Lys、Xaa-Lys-Lys-Lys-Lys、Lys-Xaa-Lys-Lys-Lys、Ly

s-Lys-Xaa-Lys-Lys、Lys-Lys-Lys-Xaa-Lys、Lys-Lys-Lys-Lys-Xaa、Xaa-Xaa-Lys-Lys-Lys、Xaa-Lys-Xaa-Lys-Lys、Xaa-Lys-Lys-Xaa-Lys、Xaa-Lys-Lys-Lys-Xaa、Lys-Xaa-Xaa-Lys-Lys、Lys-Xaa-Lys-Xaa-Lys、Lys-Xaa-Lys-Lys-Xaa、Lys-Lys-Xaa-Xaa-Lys、Lys-Lys-Xaa-Lys-Xaa、Lys-Lys-Lys-Xaa-Xaa、Lys-Lys-Xaa-Xaa-Xaa、Lys-Xaa-Lys-Xaa-Xaa、Lys-Xaa-Xaa-Lys-Xaa、Lys-Xaa-Xaa-Xaa-Lys、Xaa-Lys-Lys-Xaa-Xaa、Xaa-Lys-Xaa-Xaa-Lys、Xaa-Xaa-Lys-Lys-Xaa、Xaa-Xaa-Lys-Xaa-Lys、Xaa-Xaa-Xaa-Lys-Lys、Lys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa、Xaa-Lys-Xaa-Xaa-Xaa、Xaa-Xaa-Lys-Xaa-Xaa、Xaa-Xaa-Xaa-Lys-Xaa、Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Lys、Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa、Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys、Xaa-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys、Lys-Xaa-Lys-Lys-Lys-Lys、Lys-Lys-Xaa-Lys-Lys-Lys、Lys-Lys-Lys-Xaa-Lys-Lys、Lys-Lys-Lys-Lys-Xaa-Lys、Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Xaa、Xaa-Xaa-Lys-Lys-Lys-Lys、Xaa-Lys-Xaa-Lys-Lys-Lys、Xaa-Lys-Lys-Lys-Xaa-Lys、Xaa-Lys-Lys-Lys-Lys-Xaa、Lys-Xaa-Xaa-Lys-Lys-Lys、Lys-Xaa-Lys-Xaa-Lys-Lys、Xaa-Lys-Lys-Lys-Xaa-Lys、Lys-Lys-Xaa-Xaa-Lys-Lys、Lys-Lys-Xaa-Lys-Xaa-Lys、Lys-Lys-Xaa-Lys-Lys-Xaa、Lys-Lys-Lys-Xaa-Xaa-Lys、Lys-Lys-Lys-Xaa-Lys-Xaa、Lys-Lys-Lys-Lys-Xaa-Xaa、Xaa-Xaa-Xaa-Lys-Lys-Lys、Xaa-Xaa-Lys-Xaa-Lys-Lys、Xaa-Xaa-Lys-Lys-Xaa-Lys、Xaa-Xaa-Lys-Lys-Lys-Xaa、Xaa-Lys-Lys-Xaa-Lys-Lys、Lys-Xaa-Lys-Lys-Xaa-Lys、Xaa-Lys-Lys-Lys-Lys-Xaa、Lys-Lys-Xaa-Xaa-Lys-Lys、Lys-Xaa-Lys-Xaa-Lys-Lys、Lys-Xaa-Xaa-Lys-Lys-Xaa、Lys-Xaa-Xaa-Lys-Xaa-Lys、Lys-Xaa-Xaa-Lys-Lys-Xaa、Lys-Xaa-Xaa-Lys-Xaa-Xaa、Lys-Xaa-Xaa-Lys-Xaa-Xaa、Lys-Xaa-Xaa-Xaa-Lys-Xaa、Lys-Xaa-Xaa-Xaa-Lys-Xaa、Xaa-Lys-Lys-Xaa-Xaa-Lys、Xaa-Xaa-Lys-Lys-Xaa-Xaa、Xaa-Lys-Lys-Xaa-Xaa-Xaa、Lys-Lys-Xaa-Xaa-Xaa-Lys、Xaa-Lys-Lys-Xaa-Xaa-Xaa、Lys-Lys-Lys-Xaa-Xaa-Xaa、Lys-Lys-Xaa-Xaa-Xaa-Lys、Xaa-Xaa-Lys-Xaa-Xaa-Lys、Xaa-Xaa-Lys-Lys-Xaa-Xaa、Xaa-Xaa-Lys-Xaa-Lys-Xaa、Xaa-Xaa-Lys-Xaa-Xaa-Lys、Xaa-Xaa-Lys-Lys-Xaa-Xaa、Xaa-Xaa-Lys-Lys-Xaa-Xaa、Xaa-Xaa-Lys-Lys-Lys-Xaa-Xaa、Xaa-Lys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa

、Xaa-Xaa-Lys-Xaa-Xaa-Xaa、Xaa-Xaa-Xaa-Lys-Xaa-Xaa、Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Lys-Xaa、Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Lys、またはXaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa、ここで各XaaはAla、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Arg、His、Met、Orn、および一般式Iのアミノ酸単位から成る群より独立して選択される：



式中、 R^1 および R^2 は水素、 C_{1-6} -アルキル、フェニル、およびフェニル-メチルから成る群より選択され、ここで C_{1-6} -アルキルはハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1～3個の置換基で置換されていてもよく、そしてフェニルおよびフェニル-メチルは C_{1-6} -アルキル、 C_{2-6} -アルケニル、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1～3個の置換基で置換されていてもよいが、あるいは R^1 および R^2 はそれらが結合する炭素原子と一緒にシクロペンチル、シクロヘキシル、またはシクロヘプチル環、例えば、2,4-ジアミノブタン酸(Dbu)および2,3-ジアミノプロパン酸(Dpr)を形成する。

【請求項20】 ZがL-アミノ酸のみから成る、請求項5～18のいずれか一項に記載のペプチド複合体。

【請求項21】 Zが(Dbu)_nまたは(Dpr)_nであり、ここでnは4～15の範囲、好ましくは4～10の範囲、例えば、4～8の範囲、例えば、4～6の範囲の整数である、請求項5～7のいずれか一項に記載のペプチド複合体。

【請求項22】 ZがDpr₆である、請求項1に記載のペプチド複合体。

【請求項23】 前記薬理学的に活性なペプチド配列(X)は最大75アミノ酸単位、例えば、最大65、例えば、最大60、好ましくは最大55、例えば、最大53、例えば、最大50アミノ酸単位から成る、請求項1～22のいずれか一項に記載のペプチド複合体。

【請求項24】 Xが下記の配列から成る群より選択される、請求項16に記載のペプチド複合体：エンケファリン、Leu-エンケファリン、Met-エンケファリン、アンギオテンシンI、アンギオテンシンII、バソプレシン、エンドセリン、血管作用性小腸ペプチド、ニューロテンシン、エンドルフィン、インスリン、グ

ラミシジン、パラセルシン、デルタ睡眠誘発ペプチド、ゴナドトロピン放出ホルモン、ヒト副甲状腺ホルモン(1-34)、トランケートエритроポイエチンアナログ、特にBMP-1、心房ナトリウム尿排泄増加性ペプチド(ANP、ANF)、ヒト脳ナトリウム尿排泄増加性ペプチド(hBNP)、セクロピン、カイネテンシン、ニューロフィシン、エラフィン、グアメリン、アトリオペプチンI、アトリオペプチンII、アトリオペプチンIII、デルトルフィンI、デルトルフィンII、バソトシン、ブラディキニン、ディノルフィン、ディノルフィンA、ディノルフィンB、成長ホルモン放出因子、成長ホルモン、成長ホルモン放出ペプチド、オキシトシン、カルシトニン、カルシトニン遺伝子関係ペプチド、カルシトニン遺伝子関係ペプチドII、成長ホルモン放出ペプチド、タキキニン、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、脳のナトリウム尿排泄増加性ポリペプチド、コールシストキニン、コルチコトロピン放出因子、ジアゼパム結合阻害フラグメント、FMRF-アミド、ガラニン、胃放出ペプチド、胃阻害ポリペプチド、ガストリン、ガストリン放出ペプチド、グルカゴン、グルカゴン様ペプチド-1、グルカゴン様ペプチド-2、LHRH、メラニン濃縮ホルモン、色素胞刺激ホルモン(MSH)、アルファ-MSH、モルホリンモジュレートペプチド、モチリン、ニューロキニンA、ニューロキニンB、ニューロメジンB、ニューロメジンC、ニューロメジンK、ニューロメジンN、ニューロメジンU、ニューロペプチドK、ニューロペプチドY、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)、膵臓ポリペプチド、ペプチドYY、ペプチドヒスチジン-メチオニンアミド(PHM)、セクレチン、ソマトスタチン、サブスタンスK、チロトロピン放出ホルモン(TRH)、キョトルフィン、メラノスタチン(MIF-1)、トロネボポイエチンアナログ、特にAF12505(Ile-Glu-Gly-Pro-Thr-Leu-Arg-Gln-Trp-Leu-Ala-Ala-Arg-Ala)、インスリン様成長因子I(57-70)(Ala-Leu-Leu-Glu-Thr-Tyr-Cys-Ala-Thr-Pro-Ala-Lys-Ser-Glu)、インスリン様成長因子I(30-41)(Gly-Tyr-Gly-Ser-Ser-Ser-Arg-Arg-Ala-Pro-Gln-Thr)、インスリン様成長因子I(24-41)(Tyr-Phe-Asn-Lys-Pro-Thr-Gly-Tyr-Gly-Ser-Ser-Ser-Arg-Arg-Ala-Pro-Gln-Thr)、インスリン様成長因子II(33-40)(Ser-Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser-Arg)、インスリン様成長[tyro]因子II(33-40)(Tyr-Ser-Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser-Arg)、インスリン様成長因子II(69-84)(Asp-Val-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr-Val-Leu-Pro-Asp-Asn-Phe-

Pro-Arg-Tyr)、成長ホルモン(GH)放出ペプチド-6(GHRP-6)(His-DTrp-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂)、ベータ-インターロイキンI(163-171)(Val-Gln-Gly-Glu-Glu-Ser-Asn-Asp-Lys)、ベータ-インターロイキンII(44-56)(Ile-Leu-Asn-Gly-Ile-Asn-Asn-Tyr-Lys-Asn-Pro-Lys-Leu)、インターロイキンII(60-70)(Leu-Thr-Phe-Lys-Phe-Tyr-Met-Pro-Lys-Lys-Ala)、エキセンジン-4(GLP-1アナログ)(His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂)、エキセンジン-3(GLP-1アナログ)(His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser)、[Cys(Acm)20、30]表皮成長因子(20-31)Cys(Acm)-Met-His-Ile-Glu-Ser-Leu-Asp-Ser-Thr-Cys(Acm)、ビバルジン(Hirulog)(D-Phe-Pro-Arg-Pro-(Gly)4-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu)、ヒルログ-1 D-Phe-Pro-Arg-Pro-(Gly)4-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Tyr-Leu、C型ナトリウム尿排泄増加性ペプチド(1-53)(CNP)(Asp-Leu-Arg-Val-Asp-Thr-Lys-Ser-Arg-Ala-Ala-Trp-Ala-Arg-Leu-Leu-Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-Ala-Asn-Lys-Lys-Gly-Leu-Ser-Lys-Gly-Cys-Phe-Gly-Leu-Lys-Leu-Asp-Arg-Ile-Gly-Ser-Met-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys;ジサルファイド架橋:Cys37-Cys53)、「ミニANP」(Met-Cys-His-シクロヘキシルAla-Gly-Gly-Arg-Met-Asp-Arg-Ile-Ser-Cys-Tyr-Arg、ジサルファイド架橋:cys2-cys13)、メラノタン-II(また、MT-IIとして知られている、アルファ-MSH4-10-NH₂、またはAc-Nle4-Asp5-His6-D-Phe7-Arg8-Trp9-Lys10)、チモシンアルファ1(TA1)(Ac-Ser-Asp-Ala-Ala-Val-Asp-Thr-Ser-Ser-Glu-Ile-Thr-Thr-Lys-Asp-Leu-Lys-Glu-Lys-Lys-Glu-Val-Val-Glu-Glu-Ala-Glu-Asn)、オルニプレシン(また、8-オルニチン-バソプレシンとして知られている(POR-8)、[Phe2、Ile3、Orn8]バソプレシン)、Cys-Phe-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Orn-Gly-NH₂、ジサルファイド架橋:Cys1-Cys6)、オクトレオチド(201-995)(DPhe-Cys-Phe-DTrp-Lys-Thr-Cys-Thr-オール;ジサルファイド架橋:Cys2-Cys7)、エプチフィバチド(INTEGRILIN)、カルシトニン遺伝子関係ペプチド(CGRP)(Ala-Cys-Asp-Thr-Ala-Thr-Cys-Val-Thr-His-Arg-Leu-Ala-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-Gly-Val-Val-Lys-Asn-Asn-Phe-Val

-Pro-Thr-Asn-Val-Gly-Ser-Lys-Ala-Phe-NH₂;ジサルファイド架橋:Cys2-Cys7)
 、エンドモルフィン-1 Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂;エンドモルフィン-2 Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂;ノシセプチン(また、オルファニンFQとして知られている、Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln)、アンギオテンシノゲン(1-13)(Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His)、アドレノモズリン(1-12)(Tyr-Arg-Gln-Ser-Met-Asn-Asn-Phe-Gln-Gly-Leu-Arg)、抗不整脈性ペプチド(AAP)(Gly-Pro-Hyp-Gly-Ala-Gly)、アンタゴニストG(Arg-D-Trp-(nMe)Phe-D-Trp-Leu-Met-NH₂)、インドリシジン(Ile-Leu-Pro-Trp-Lys-Trp-Pro-Trp-Trp-Pro-Trp-Arg-Arg-NH₂)、オステオカルシン(37-49)(Gly-Phe-Gln-Glu-Ala-Tyr-Arg-Arg-Phe-Tyr-Gly-Pro-Val)、コルチスタチン29(1-13)(Glp)-Glu-Arg-Pro-Pro-Leu-Gln-Gln-Pro-Pro-His-Arg-Asp)、コルチスタチン14 Pro-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Ser-Ser-Cys-Lys;ジサルファイド架橋:Cys2-Cys13、PD-145065(Ac-D-Bhg-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp)、PD-142893(Ac-D-Dip-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp)、フィブリノゲン結合インヒビターペプチド(His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val)、レプチン(93-105)(Asn-Val-Ile-Gln-Ile-Ser-Asn-Asp-Leu-Glu-Asn-Leu-Arg)、GR83074(Boc-Arg-Ala-D-Trp-Phe-D-Pro-Pro-Nle-NH₂)、Tyr-W-MIF-1(Tyr-Pro-Trp-Gly-NH₂)、副甲状腺ホルモン関係ペプチド(107-111)(Thr-Arg-Ser-Ala-Trp)、アンギオテンシノゲン(1-14)Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Asn、ロイペプチン(Ac-Leu-Leu-Arg-CHO)、およびそれらの任意の修飾またはトランケートアナログ。

【請求項25】 複合体が下記のものから成る群より選択される、請求項1~24のいずれか一項に記載のペプチド複合体

H-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-Lys₆-NH₂ (GHRH(1-44)(ヒト)-Lys₆-NH₂);

H-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-Glu₆-NH₂ (GHRH(1-44)(ヒト)-Glu₆-NH₂);

H-Lys₆-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn

-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe
-OH(Lys₆-PTH(1-34)(ヒト)-OH);

H-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-
Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-Lys₆-
-OH(PTH(1-34)(ヒト)-Lys₆-OH);

H-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-
Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Lys₆-OH(GLP-1-(7-36)
(ヒト)-Lys₆-OH);

【化1】

H-Gly-Gly-Thr-Tyr-Ser-Cys(Acm)-His-Phe-Gly-Pro-Leu-Thr-Trp-Val-Cys(Acm)-Lys-Pro-
Gln-Gly-Gly-Lys₆-OH (EMP-1-Lys₆-OH);

H- Lys₆-Gly-Gly-Thr-Tyr-Ser-Cys(Acm)-His-Phe-Gly-Pro-Leu-Thr-Trp-Val-Cys(Acm)-
Lys-Pro-Gln-Gly-Gly-OH (Lys₆-EMP-1-OH);

H- Lys₆-Gly-Gly-Thr-Tyr-Ser-Cys(Acm)-His-Phe-Gly-Pro-Leu-Thr-Trp-Val-Cys(Acm)-
Lys-Pro-Gln-Gly-Gly- Lys₆-OH (Lys₆-EMP-1- Lys₆-OH);

H-Aib-His-2-D-Nal-D-Phe-Lys-(Lys)₆-NH₂ (GHRP-(Lys)₆-NH₂);

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys-Lys-Glu-Glu-Glu-Lys-OH(Leu-エンケファリン-Ly
s-Glu-Glu-Glu-Lys-OH);

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys-Glu-Glu-Glu-Glu-Lys-OH(Leu-エンケファリン-Ly
s-Glu-Glu-Glu-Glu-Lys-OH);

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys-Glu-Glu-Glu-Glu-Lys-OH(Leu-エンケファリン-(L
ys-Glu)₃);

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Dpr)₆-OH(Leu-エンケファリン-(Dpr)₆-OH);

H-Lys₆-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH(H-Lys₆-Leu-エンケファリン);

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys₆-OH(H-Leu-エンケファリン-Lys₆);

H-Lys₆-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys₆-OH(H-Lys₆-Leu-エンケファリン-Lys₆-OH);

Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-(Lys)₆-OH(GnRH-Lys₆-OH);

Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-(Lys-Glu)₃-OH(GnRH-(Lys-Glu)₃-OH);および

H-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-(Lys-Glu)₃-OH(PTH1-34ヒト-(Lys-Glu)₃-OH)。

【請求項26】 工程：

a) カルボキシル活性化形態、C末端活性化形態のN- α -保護アミノ酸、またはN- α -保護ジペプチドを固定化ペプチド配列H-Z-SSM₁にカップリングし、これにより固定化N- α -保護ペプチドフラグメントを形成し、

b) N- α -保護基を除去し、これにより非保護N末端を有する固定化ペプチドフラグメントを形成し、

c) 追加のカルボキシル活性化形態のN- α -保護アミノ酸、または追加のC末端活性化形態のN- α -保護ジペプチドを固定化ペプチドフラグメントのN末端にカップリングさせ、そして所望ペプチド配列Xが得られるまで、工程b)およびc)における除去／カップリング工程の手順を反復し、次いで

d) 固体支持体物質からペプチド複合体を切断する、
を含んでなる、請求項2に記載の薬理学的に活性なペプチド複合体(X-Z)を製造する方法。

【請求項27】 工程：

a) N- α -保護アミノ酸またはN- α -保護ジペプチドを固体支持体の物質(SSM₁)にカップリングさせ、これにより固定化N- α -保護アミノ酸を形成し、

b) N- α -保護基を除去し、これにより非保護N末端を有する固定化アミノ酸またはペプチドフラグメントを形成し、

c) 追加のカルボキシル活性化形態のN- α -保護アミノ酸、または追加のC末端活性化形態のN- α -保護ジペプチドを固定化アミノ酸またはペプチドフラグメントのN末端にカップリングさせ、そして所望ペプチド配列Xが得られるまで、工程b)およびc)における除去／カップリング工程の手順を反復し、

d) 追加のカルボキシル活性化形態のN- α -保護アミノ酸、または追加のC末

端活性化形態の $N\text{-}\alpha$ -保護ジペプチドを固定化ペプチドフラグメントの N 末端にカップリングさせ、そして所望ペプチド配列 Z が得られるまで、工程b)およびd)における除去／カップリング工程の手順を反復し、次いで

e) 固体支持体物質からペプチド複合体を切断する、
を含んでなる、請求項3に記載の薬理学的に活性なペプチド複合体($Z\text{-}X$)を製造する方法。

【請求項28】 工程：

a) カルボキシル活性化形態の $N\text{-}\alpha$ -保護アミノ酸、または C 末端活性化形態の $N\text{-}\alpha$ -保護ジペプチドを固定化ペプチド配列 $H\text{-}Z\text{-}SSM_1$ にカップリングし、これにより固定化 $N\text{-}\alpha$ -保護ペプチドフラグメントを形成し、

b) $N\text{-}\alpha$ -保護基を除去し、これにより非保護 N 末端を有する固定化ペプチドフラグメントを形成し、

c) 追加のカルボキシル活性化形態の $N\text{-}\alpha$ -保護アミノ酸、または追加の C 末端活性化形態の $N\text{-}\alpha$ -保護ジペプチドを固定化ペプチドフラグメントの N 末端にカップリングさせ、そして所望ペプチド配列 X が得られるまで、工程b)およびc)における除去／カップリング工程の手順を反復し、次いで

d) 追加のカルボキシル活性化形態の $N\text{-}\alpha$ -保護アミノ酸、または追加の C 末端活性化形態の $N\text{-}\alpha$ -保護ジペプチドを固定化ペプチドフラグメントの N 末端にカップリングさせ、そして所望ペプチド配列 Z が得られるまで、工程b)およびd)における除去／カップリング工程の手順を反復し、次いで

e) 固体支持体物質からペプチド複合体を切断する、
を含んでなる、請求項4に記載の薬理学的に活性なペプチド複合体($Z\text{-}X\text{-}Z$)を製造する方法。

【請求項29】 工程：

a) ペプチド複合体をコードする核酸配列を宿主細胞の中に導入し、

b) 前記宿主細胞を培養し、そして

c) 前記複合体を培養物から単離する、

を含んでなる、請求項1に記載のペプチド複合体を製造する方法。

【請求項30】 工程：

a) ペプチド複合体の産生を可能とする条件下に、ペプチド複合体をコードする核酸配列を含む組換え宿主細胞を培養し、そして

b) 前記複合体を培養物から単離する、
を含んでなる、請求項1に記載のペプチド複合体を製造する方法。

【請求項31】 前記複合体をコードする核酸配列が核酸構築物またはベクター内に含有されている、請求項29または30に記載の方法。

【請求項32】 請求項1～25のいずれか一項に記載の薬理学的に活性なペプチド複合体と、薬学上許容される担体とを含んでなる医薬組成物。

【請求項33】 H-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu-(Lys-Glu)₃-OH、
、
H-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu-(Glu)₆-OH、
H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Glu)₆-OH、または
H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Lys)₆-OH、および薬学上許容される担体、
を含んでなる医薬組成物。

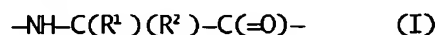
【請求項34】 療法に使用するための請求項1～25のいずれか一項に記載の薬理学的に活性なペプチド複合体。

【請求項35】 H-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu-(Lys-Glu)₃-OH、
、
H-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu-(Glu)₆-OH、
H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Glu)₆-OH、および
H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Lys)₆-OH、
から成る群より選択される療法に使用するための薬理学的に活性なペプチド複合体。

【請求項36】 疼痛、HIV、癌、糖尿病、失禁、高血圧症、記憶消失、アルツハイマー病、熱、鬱病、性ホルモン調節、摂食、精神分裂病、骨粗しょう症および不眠の治療において使用するための医薬組成物を製造するための、請求項1～25のいずれか一項に記載の薬理学的に活性なペプチド複合体の使用。

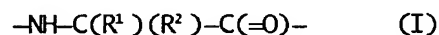
【請求項37】 エンケファリンと、Xに共有結合した4～20アミノ酸の安定化配列Zとを含んでなる複合体を、それを必要とする被検体に投与することを含

む、ニューロンが疼痛衝撃を脊髄に伝達するのを抑制する方法：ここでZはAla、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Met、Orn、および一般式Iのアミノ酸単位から成る群より選択される：



式中、 R^1 および R^2 は水素、 C_{1-6} -アルキル、フェニル、およびフェニル-メチルから成る群より選択され、ここで C_{1-6} -アルキルはハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1～3個の置換基で置換されていてもよく、そしてフェニルおよびフェニル-メチルは C_{1-6} -アルキル、 C_{2-6} -アルケニル、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1～3個の置換基で置換されていてもよいが、あるいは R^1 および R^2 はそれらが結合する炭素原子と一緒にシクロペンチル、シクロヘキシル、またはシクロヘプチル環、例えば、2,4-ジアミノブタン酸および2,3-ジアミノプロパン酸を形成し；そして前記ペプチド複合体の半減期とエンケファリンの半減期との間の比は、約50mMのリン酸塩緩衝液中で約pH7.4、約37℃において、あるいは血漿または血清中でカルボキシペプチダーゼAまたはロイシンアミノペプチダーゼで処理するとき、少なくとも約2、好ましくは少なくとも約3、例えば、少なくとも約5、より好ましくは少なくとも約7、例えば、少なくとも約9、例えば、少なくとも約10であるか、あるいは前記Xが経口的に吸収されないとき、前記ペプチド複合体はニューロンが疼痛衝撃を脊髄に伝達するのを抑制するために有効量で経口的に吸収される。

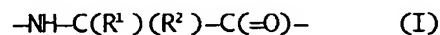
【請求項38】 疼痛の治療において使用する医薬組成物を製造するための、エンケファリンと、Xに共有結合した4～20アミノ酸の安定化配列Zとを含んでなる複合体の使用：ここでZはAla、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Met、Orn、および一般式Iのアミノ酸単位から成る群より選択される：



式中、 R^1 および R^2 は水素、 C_{1-6} -アルキル、フェニル、およびフェニル-メチルから成る群より選択され、ここで C_{1-6} -アルキルはハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1～

3個の置換基で置換されていてもよく、そしてフェニルおよびフェニル-メチルは C_{1-6} -アルキル、 C_{2-6} -アルケニル、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1~3個の置換基で置換されていてもよい、あるいは R^1 および R^2 はそれらが結合する炭素原子と一緒になってシクロペンチル、シクロヘキシル、またはシクロヘプチル環、例えば、2,4-ジアミノブタン酸および2,3-ジアミノプロパン酸を形成し；そして前記ペプチド複合体の半減期とエンケファリンの半減期との間の比は、約50mMのリン酸塩緩衝液中で約pH7.4、約37℃において、あるいは血漿または血清中でカルボキシペプチダーゼAまたはロイシンアミノペプチダーゼで処理するとき、少なくとも約2、好ましくは少なくとも約3、例えば、少なくとも約5、より好ましくは少なくとも約7、例えば、少なくとも約9、例えば、少なくとも約10であるか、あるいは前記Xが経口的に吸収されないとき、前記ペプチド複合体は経口的に吸収される。

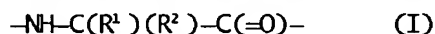
【請求項39】 成長ホルモン放出ホルモンまたは成長ホルモン放出ペプチドと、Xに共有結合した4~20アミノ酸の安定化配列Zとを含んでなる複合体を、それを必要とする被検体に投与することからなる、下垂体からの成長ホルモンの放出を刺激する方法：ここでZはAla、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Met、Orn、および一般式Iのアミノ酸単位から成る群より選択される：



式中、 R^1 および R^2 は水素、 C_{1-6} -アルキル、フェニル、およびフェニル-メチルから成る群より選択され、ここで C_{1-6} -アルキルはハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1~3個の置換基で置換されていてもよく、そしてフェニルおよびフェニル-メチルは C_{1-6} -アルキル、 C_{2-6} -アルケニル、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1~3個の置換基で置換されていてもよい、あるいは R^1 および R^2 はそれらが結合する炭素原子と一緒になってシクロペンチル、シクロヘキシル、またはシクロヘプチル環、例えば、2,4-ジアミノブタン酸および2,3-ジアミノプロパン酸を形成し；そして前記

ペプチド複合体の半減期と成長ホルモン放出ホルモンまたは成長ホルモン放出ペプチドの半減期との間の比は、約50mMのリン酸塩緩衝液中で約pH7.4、約37℃において、あるいは血漿または血清中でカルボキシペプチダーゼAまたはロイシンアミノペプチダーゼで処理するとき、少なくとも約2、好ましくは少なくとも約3、例えば、少なくとも約5、より好ましくは少なくとも約7、例えば、少なくとも約9、例えば、少なくとも約10であるか、あるいはXが経口的に吸収されないとき、前記ペプチド複合体は成長ホルモンの放出を刺激するために有効量で経口的に吸収される。

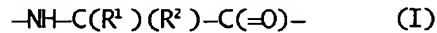
【請求項40】 成長ホルモンの放出を刺激するために使用する医薬組成物を製造するための、成長ホルモン放出ホルモンまたは成長ホルモン放出ペプチドと、Xに共有結合した4~20アミノ酸の安定化配列Zとを含んでなる複合体の使用：ここでZはAla、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Met、Orn、および一般式Iのアミノ酸単位から成る群より選択される：



式中、 R^1 および R^2 は水素、 C_{1-6} -アルキル、フェニル、およびフェニル-メチルから成る群より選択され、ここで C_{1-6} -アルキルはハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1~3個の置換基で置換されていてもよく、そしてフェニルおよびフェニル-メチルは C_{1-6} -アルキル、 C_{2-6} -アルケニル、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1~3個の置換基で置換されていてもよい、あるいは R^1 および R^2 はそれらが結合する炭素原子と一緒にシクロペンチル、シクロヘキシル、またはシクロヘプチル環、例えば、2,4-ジアミノブタン酸および2,3-ジアミノプロパン酸を形成し；そして前記ペプチド複合体の半減期と成長ホルモン放出ホルモンまたは成長ホルモン放出ペプチドの半減期との間の比は、約50mMのリン酸塩緩衝液中で約pH7.4、約37℃において、あるいは血漿または血清中でカルボキシペプチダーゼAまたはロイシンアミノペプチダーゼで処理するとき、少なくとも約2、好ましくは少なくとも約3、例えば、少なくとも約5、より好ましくは少なくとも約7、例えば、少なくとも約9、例えば、少なくとも約10であるか、あるいは前記Xが経口的に吸収され

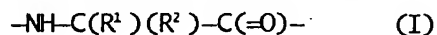
ないとき、前記ペプチド複合体は経口的に吸収される。

【請求項41】 EMP-1と、Xに共有結合した4～20アミノ酸の安定化配列Zとを含んでなる複合体を、それを必要とする被検体に投与することを含む、ヘモグロビンのレベルを増加する方法：ここでZはAla、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Met、Orn、および一般式Iのアミノ酸単位から成る群より選択される：



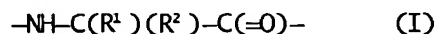
式中、 R^1 および R^2 は水素、 C_{1-6} -アルキル、フェニル、およびフェニル-メチルから成る群より選択され、ここで C_{1-6} -アルキルはハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1～3個の置換基で置換されていてもよく、そしてフェニルおよびフェニル-メチルは C_{1-6} -アルキル、 C_{2-6} -アルケニル、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1～3個の置換基で置換されていてもよい、あるいは R^1 および R^2 はそれらが結合する炭素原子と一緒にシクロペンチル、シクロヘキシル、またはシクロヘプチル環、例えば、2,4-ジアミノブタン酸および2,3-ジアミノプロパン酸を形成し；そして前記ペプチド複合体の半減期とEMP-1の半減期との間の比は、約50mMのリン酸塩緩衝液中で約pH7.4、約37℃において、あるいは血漿または血清中でカルボキシペプチダーゼAまたはロイシンアミノペプチダーゼで処理するとき、少なくとも約2、好ましくは少なくとも約3、例えば、少なくとも約5、より好ましくは少なくとも約7、例えば、少なくとも約9、例えば、少なくとも約10であるか、あるいは前記Xが経口的に吸収されないとき、前記ペプチド複合体はヘモグロビンのレベルを増加するために有効量で経口的に吸収される。

【請求項42】 ヘモグロビンのレベルを増加することによって貧血を治療するために使用する医薬組成物を製造するための、EMP-1と、Xに共有結合した4～20アミノ酸の安定化配列Zとを含んでなる複合体の使用：ここでZはAla、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Met、Orn、および一般式Iのアミノ酸単位から成る群より選択される：



式中、 R^1 および R^2 は水素、 C_{1-6} -アルキル、フェニル、およびフェニル-メチルから成る群より選択され、ここで C_{1-6} -アルキルはハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される 1～3個の置換基で置換されていてもよく、そしてフェニルおよびフェニル-メチルは C_{1-6} -アルキル、 C_{2-6} -アルケニル、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される 1～3個の置換基で置換されていてもよい、あるいは R^1 および R^2 はそれらが結合する炭素原子と一緒にシクロペンチル、シクロヘキシル、またはシクロヘプチル環、例えば、2,4-ジアミノブタン酸および2,3-ジアミノプロパン酸を形成し；そして前記ペプチド複合体の半減期と EMP-1の半減期との間の比は、約50mMのリン酸塩緩衝液中で約pH7.4、約37℃において、あるいは血漿または血清中でカルボキシペプチダーゼAまたはロイシンアミノペプチダーゼで処理するとき、少なくとも約2、好ましくは少なくとも約3、例えば、少なくとも約5、より好ましくは少なくとも約7、例えば、少なくとも約9、例えば、少なくとも約10であるか、あるいは前記Xが経口的に吸収されないとき、前記ペプチド複合体は経口的に吸収される。

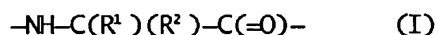
【請求項43】 副甲状腺ホルモンと、Xに共有結合した4～20アミノ酸の安定化配列Zとを含んでなる複合体を、それを必要とする被検体に投与することを含む、破骨活性と骨芽細胞活性との間の均衡を変更することによって骨の喪失を予防または治療する方法：ここでZはAla、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Met、Orn、および一般式Iのアミノ酸単位から成る群より選択される：



式中、 R^1 および R^2 は水素、 C_{1-6} -アルキル、フェニル、およびフェニル-メチルから成る群より選択され、ここで C_{1-6} -アルキルはハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される 1～3個の置換基で置換されていてもよく、そしてフェニルおよびフェニル-メチルは C_{1-6} -アルキル、 C_{2-6} -アルケニル、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される 1～3個の置換基で置換されていてもよい、あるいは R^1 および R^2 はそれらが結合する炭素原子と

一緒になってシクロペンチル、シクロヘキシル、またはシクロヘプチル環、例えば、2,4-ジアミノブタン酸および2,3-ジアミノプロパン酸を形成し；そして前記ペプチド複合体の半減期と副甲状腺ホルモンの半減期との間の比は、約50mMのリン酸塩緩衝液中で約pH7.4、約37℃において、あるいは血漿または血清中でカルボキシペプチダーゼAまたはロイシンアミノペプチダーゼで処理するとき、少なくとも約2、好ましくは少なくとも約3、例えば、少なくとも約5、より好ましくは少なくとも約7、例えば、少なくとも約9、例えば、少なくとも約10であるか、あるいは前記Xが経口的に吸収されないとき、前記ペプチド複合体は骨の喪失を治療または予防するために有効量で経口的に吸収される。

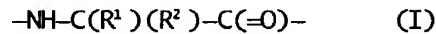
【請求項44】 骨粗しょう症の予防または治療において使用する医薬組成物を製造するための、副甲状腺ホルモンと、Xに共有結合した4~20アミノ酸の安定化配列Zとを含んでなる複合体の使用：ここでZはAla、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Met、Orn、および一般式Iのアミノ酸単位から成る群より選択される：



式中、 R^1 および R^2 は水素、 C_{1-6} -アルキル、フェニル、およびフェニル-メチルから成る群より選択され、ここで C_{1-6} -アルキルはハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1~3個の置換基で置換されていてもよく、そしてフェニルおよびフェニル-メチルは C_{1-6} -アルキル、 C_{2-6} -アルケニル、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1~3個の置換基で置換されていてもよいが、あるいは R^1 および R^2 はそれらが結合する炭素原子と一緒にシクロペンチル、シクロヘキシル、またはシクロヘプチル環、例えば、2,4-ジアミノブタン酸および2,3-ジアミノプロパン酸を形成し；そして前記ペプチド複合体の半減期と副甲状腺ホルモンの半減期との間の比は、約50mMのリン酸塩緩衝液中で約pH7.4、約37℃において、あるいは血漿または血清中でカルボキシペプチダーゼAまたはロイシンアミノペプチダーゼで処理するとき、少なくとも約2、好ましくは少なくとも約3、例えば、少なくとも約5、より好ましくは少なくとも約7、例えば、少なくとも約9、例えば、少なくとも約10であるか、

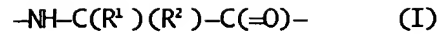
あるいは前記Xが経口的に吸収されないとき、前記ペプチド複合体は経口的に吸収される。

【請求項45】 グルコガン様ペプチド-1と、Xに共有結合した4~20アミノ酸の安定化配列Zとを含んでなる複合体を、それを必要とする被検体に投与することを含む、血液グルコースレベルを減少する方法：ここでZはAla、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Met、Orn、および一般式Iのアミノ酸単位から成る群より選択される：



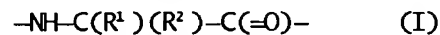
式中、 R^1 および R^2 は水素、 C_{1-6} -アルキル、フェニル、およびフェニル-メチルから成る群より選択され、ここで C_{1-6} -アルキルはハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1~3個の置換基で置換されていてもよく、そしてフェニルおよびフェニル-メチルは C_{1-6} -アルキル、 C_{2-6} -アルケニル、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1~3個の置換基で置換されていてもよい。あるいは R^1 および R^2 はそれらが結合する炭素原子と一緒にシクロペンチル、シクロヘキシル、またはシクロヘプチル環、例えば、2,4-ジアミノブタン酸および2,3-ジアミノプロパン酸を形成し；そして前記ペプチド複合体の半減期とグルコガン様ペプチド-1の半減期との間の比は、約50mMのリン酸塩緩衝液中で約pH7.4、約37℃において、あるいは血漿または血清中でカルボキシペプチダーゼAまたはロイシンアミノペプチダーゼで処理するとき、少なくとも約2、好ましくは少なくとも約3、例えば、少なくとも約5、より好ましくは少なくとも約7、例えば、少なくとも約9、例えば、少なくとも約10であるか、あるいは前記Xが経口的に吸収されないとき、前記ペプチド複合体は血液グルコースレベルを減少するために有効量で経口的に吸収される。

【請求項46】 糖尿病の治療において使用する医薬組成物を製造するための、グルコガン様ペプチド-1と、Xに共有結合した4~20アミノ酸の安定化配列Zとを含んでなる複合体の使用：ここでZはAla、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Met、Orn、および一般式Iのアミノ酸単位から成る群より選択される：



式中、 R^1 および R^2 は水素、 C_{1-6} -アルキル、フェニル、およびフェニル-メチルから成る群より選択され、ここで C_{1-6} -アルキルはハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1～3個の置換基で置換されていてもよく、そしてフェニルおよびフェニル-メチルは C_{1-6} -アルキル、 C_{2-6} -アルケニル、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1～3個の置換基で置換されていてもよいが、あるいは R^1 および R^2 はそれらが結合する炭素原子と一緒にシクロペンチル、シクロヘキシル、またはシクロヘプチル環、例えば、2,4-ジアミノブタン酸および2,3-ジアミノプロパン酸を形成し；そして前記ペプチド複合体の半減期とグルカゴン様ペプチド-1の半減期との間の比は、約50mMのリン酸塩緩衝液中で約pH7.4、約37℃において、あるいは血漿または血清中でカルボキシペプチダーゼAまたはロイシンアミノペプチダーゼで処理するとき、少なくとも約2、好ましくは少なくとも約3、例えば、少なくとも約5、より好ましくは少なくとも約7、例えば、少なくとも約9、例えば、少なくとも約10であるか、あるいは前記Xが経口的に吸収されないとき、前記ペプチド複合体は経口的に吸収される。

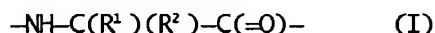
【請求項47】 ギナドトロピン放出ホルモンと、Xに共有結合した4～20アミノ酸の安定化配列Zとを含んでなる複合体を、それを必要とする被検体に投与することを含む、性ホルモンの産生を調節する方法：ここでZはAla、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Met、Orn、および一般式Iのアミノ酸単位から成る群より選択される：



式中、 R^1 および R^2 は水素、 C_{1-6} -アルキル、フェニル、およびフェニル-メチルから成る群より選択され、ここで C_{1-6} -アルキルはハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1～3個の置換基で置換されていてもよく、そしてフェニルおよびフェニル-メチルは C_{1-6} -アルキル、 C_{2-6} -アルケニル、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1～3個の置換基

で置換されていてもよい、あるいは R^1 および R^2 はそれらが結合する炭素原子と一緒に becoming シクロペンチル、シクロヘキシル、またはシクロヘプチル環、例えば、2,4-ジアミノブタン酸および2,3-ジアミノプロパン酸を形成し；そして前記ペプチド複合体の半減期とゴナドトロピンの半減期との間の比は、約50mMのリン酸塩緩衝液中で約pH7.4、約37℃において、あるいは血漿または血清中でカルボキシペプチダーゼAまたはロイシンアミノペプチダーゼで処理するとき、少なくとも約2、好ましくは少なくとも約3、例えば、少なくとも約5、より好ましくは少なくとも約7、例えば、少なくとも約9、例えば、少なくとも約10であるか、あるいは前記Xが経口的に吸収されないとき、前記ペプチド複合体は性ホルモンを調節するために有効量で経口的に吸収される。

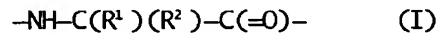
【請求項48】 性ホルモンのレベルの調節において使用する医薬組成物を製造するための、ゴナドトロピン放出ホルモンと、Xに共有結合した4~20アミノ酸の安定化配列Zとを含んでなる複合体の使用：ここでZはAla、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Met、Orn、および一般式Iのアミノ酸単位から成る群より選択される：



式中、 R^1 および R^2 は水素、 C_{1-6} -アルキル、フェニル、およびフェニル-メチルから成る群より選択され、ここで C_{1-6} -アルキルはハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1~3個の置換基で置換されていてもよく、そしてフェニルおよびフェニル-メチルは C_{1-6} -アルキル、 C_{2-6} -アルケニル、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1~3個の置換基で置換されていてもよい、あるいは R^1 および R^2 はそれらが結合する炭素原子と一緒に becoming シクロペンチル、シクロヘキシル、またはシクロヘプチル環、例えば、2,4-ジアミノブタン酸および2,3-ジアミノプロパン酸を形成し；そして前記ペプチド複合体の半減期とゴナドトロピン放出ホルモンの半減期との間の比は、約50mMのリン酸塩緩衝液中で約pH7.4、約37℃において、あるいは血漿または血清中でカルボキシペプチダーゼAまたはロイシンアミノペプチダーゼで処理するとき、少なくとも約2、好ましくは少なくとも約3、例えば、少なくとも約5、よ

り好ましくは少なくとも約7、例えば、少なくとも約9、例えば、少なくとも約10であるか、あるいは前記Xが経口的に吸収されないとき、前記ペプチド複合体は経口的に吸収される。

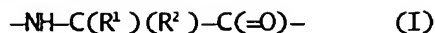
【請求項49】 デルタ睡眠誘発ペプチドと、Xに共有結合した4～20アミノ酸の安定化プロープZとを含んでなる複合体を、それを必要とする被検体に投与することを含む、睡眠障害を治療する方法：ここでZはAla、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Met、Orn、および一般式Iのアミノ酸単位から成る群より選択される：



式中、 R^1 および R^2 は水素、 C_{1-6} -アルキル、フェニル、およびフェニル-メチルから成る群より選択され、ここで C_{1-6} -アルキルはハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1～3個の置換基で置換されていてもよく、そしてフェニルおよびフェニル-メチルは C_{1-6} -アルキル、 C_{2-6} -アルケニル、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1～3個の置換基で置換されていてもよいが、あるいは R^1 および R^2 はそれらが結合する炭素原子と一緒にシクロペンチル、シクロヘキシル、またはシクロヘプチル環、例えば、2,4-ジアミノブタン酸および2,3-ジアミノプロパン酸を形成し；そして前記ペプチド複合体の半減期とデルタ睡眠誘発ペプチドの半減期との間の比は、約50mMのリン酸塩緩衝液中で約pH7.4、約37℃において、あるいは血漿または血清中でカルボキシペプチダーゼAまたはロイシンアミノペプチダーゼで処理するとき、少なくとも約2、好ましくは少なくとも約3、例えば、少なくとも約5、より好ましくは少なくとも約7、例えば、少なくとも約9、例えば、少なくとも約10であるか、あるいは薬理的活性ペプチドXが経口的に吸収されないとき、前記複合体は睡眠障害を治療するために有効量で経口的に吸収される。

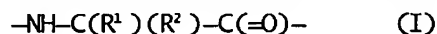
【請求項50】 睡眠障害の治療において使用する医薬組成物を製造するための、デルタ睡眠誘発ペプチドと、Xに共有結合した4～20アミノ酸の安定化プロープZとを含んでなる複合体の使用：ここでZはAla、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Met、Orn、および一般式Iのアミノ酸単位から

成る群より選択される：



式中、 R^1 および R^2 は水素、 C_{1-6} -アルキル、フェニル、およびフェニル-メチルから成る群より選択され、ここで C_{1-6} -アルキルはハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1～3個の置換基で置換されていてもよく、そしてフェニルおよびフェニル-メチルは C_{1-6} -アルキル、 C_{2-6} -アルケニル、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1～3個の置換基で置換されていてもよいが、あるいは R^1 および R^2 はそれらが結合する炭素原子と一緒にシクロペンチル、シクロヘキシル、またはシクロヘプチル環、例えば、2,4-ジアミノブタン酸および2,3-ジアミノプロパン酸を形成し；そして前記ペプチド複合体の半減期とサブスタンスPの半減期との間の比は、約50mMのリン酸塩緩衝液中で約pH7.4、約37℃において、あるいは血漿または血清中でカルボキシペプチダーゼAまたはロイシンアミノペプチダーゼで処理するとき、少なくとも約2、好ましくは少なくとも約3、例えば、少なくとも約5、より好ましくは少なくとも約7、例えば、少なくとも約9、例えば、少なくとも約10であるか、あるいは薬理的に活性なペプチドXが経口的に吸収されないとき、前記複合体は経口的に吸収される。

【請求項51】 請求項1～26のいずれか一項に記載の薬理的に活性なペプチド複合体またはその塩を製造するための4～20アミノ酸単位の安定化ペプチド配列(Z)の使用、ここで前記安定化ペプチド配列Z中の各アミノ酸単位はAla、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Met、Orn、および一般式Iのアミノ酸単位から成る群より選択される：



式中、 R^1 および R^2 は水素、 C_{1-6} -アルキル、フェニル、およびフェニル-メチルから成る群より選択され、ここで C_{1-6} -アルキルはハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1～3個の置換基で置換されていてもよく、そしてフェニルおよびフェニル-メチルは C_{1-6} -アルキル、 C_{2-6} -アルケニル、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニ

トロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1～3個の置換基で置換されていてもよいが、あるいはR¹およびR²はそれらが結合する炭素原子と一緒になってシクロペンチル、シクロヘキシル、またはシクロヘプチル環を形成する。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、酵素切断に対する傾向が減少した薬理学的に活性なペプチド複合体に関する。

【0002】

発明の背景

多数の薬理学的に活性なペプチド、例えば、人間または動物の中に天然に存在するペプチド、またはこのようなペプチドの合成アナログが存在する。このようなペプチドの例示的例は、非常に大きい数の合成アナログを生ずる、アナログ的に活性なペプチドのエンケファリンである。しかしながら、正確に消化特質のために、投与経路はむしろ制限されてきている。こうして、ペプチドは急速に、非常に効果的に酵素により分解され、一般に数分の範囲の半減期を有する。プロテアーゼおよび他のタンパク質分解酵素は、特に胃腸管の中に、偏在し、したがってペプチドは経口投与時に、ある程度まで、血液、肝臓、腎臓、および血管内皮中の多数の部位における分解に対して通常感受性である。さらに、所定のペプチドは通常主鎖内の2以上の結合における分解に対して感受性である；加水分解の各位置はある種のプロテアーゼにより仲介される。このような障害が克服された場合でさえ、特に神経ペプチドについて、血液脳関門を横切る輸送において困難に直面してきている。

【0003】

早期の分解に対してペプチドを保護する、多数の試みが存在してきている（下記の参考文献において概観されている：Prokai, 1997, Exp.Opin.Ther.Patent 7:233-245; Tamai 他、1996, Adv.Drug Delivery Rev. 19:401-424およびZhou 他、1991, Int.J.Pharm. 75:97-115）。1つのアプローチは、マンニトール、アラビノース、ラクタミド、生理食塩水、尿素、グリセロールおよびラジオグラフコントラスト剤の高張溶液の注入により、血液脳関門を浸透圧的に変更することを包含する。しかしながら、毒性の副作用があるようである。

【0004】

他のアプローチは、プロテアーゼインヒビターの使用を包含する(下記の参考文献において概観されている: Zhou 他、1991、Int.J.Pharm 75:97-115)。このアプローチは雑多の結果を生ずる。

第3のアプローチは、ペプチド処方物における吸収エンハンサーの使用を含んだ(下記の参考文献において概観されている: Zhou 他、1991、Int.J.Pharm. 75:97-115)。例は脂肪酸および胆汁酸を包含する。しかしながら、効能に関して変化する結果が得られ、そして特定のエンハンサーの価値は使用する投与経路に依存する。

【0005】

ペプチドの吸収を増強する他のアプローチは、例えば、親油性部分を結合させることによって、ペプチドを化学的に修飾することを包含する。また、N末端にピログルタミル残基を結合させることにより、加水分解に対して化合物を比較的耐性にできることが見出された。Argのアミノ末端にN-メチル基を付加し、D-LeuをL-Leuで置換し、そしてカルボキシ末端にエチルアミンを付加することにより、ジノルフィンアナログ、すなわち、E2078を化学的に修飾させて、酵素分解に対してより安定にすることが、Tamai 他、1996、Adv.Drug Delivery Rev. 19:401-404に記載されている。

【0006】

異なるアプローチはキメラペプチドの形成を包含する。このアプローチは、血液脳関門を通して常態で輸送されないペプチドを、レセプター仲介または吸着因子仲介トランスサイトosisを行うペプチドまたはタンパク質「ベクター」にカップリングさせることを包含する。

WO98/22577号には、下記式を有する「安定化ペプチド」を結合または挿入することによって、タンパク質分解的分解に対する「コアタンパク質」に対する抵抗を増加する方法が開示されている: $[(Gly)_x]X(Gly)_yY[(Gly)_z]Z)_n$ 、ここでX、Y、およびZはアラニン、セリン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、およびスレオニンであることができる。

【0007】

米国特許第5,545,719号には、神経成長を刺激できるタンパク質フラグメント

の活性領域に対して相同性のタンパク質フラグメントからなる分子(神経向性タンパク質、例えば、表皮成長因子、ツブリン、神経成長因子、ラミニン、フィブロネクチン、ヌカム(ncam)およびエベンジミン)が開示されており、このようなタンパク質フラグメントは二次分子に接続された80アミノ酸以下の長さを有し、二次分子は起源タンパク質、他のタンパク質または非タンパク質部分に由来する第2タンパク質フラグメントであることができる。この二次分子は血液脳関門を横切るペプチドの輸送を促進する。第3欄、第3~7行には、「中枢神経系に入ると、プロドラッグは無傷に止まることができるか、あるいは担体とタンパク質フラグメントとの間の化学結合を加水分解し、これにより担体をフラグメントから分離して、神経成長刺激因子を解放することができる」ことが記載されている。タンパク質に対する二次分子のカップリングを促進する好ましい方法は、1またはそれ以上の塩基性アミノ酸、好ましくは1対のLys残基、Arg残基、またはArg-Lysを介する。

【0008】

β -ガラクトシダーゼ、RNアーゼAおよびシュードモナス(pseudomonas)エキソトキシンAのドメインIIIに対して種々のTatペプチドフラグメントを化学的にカップリングすることは、Fawell 他、1994、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:664-668に開示されている。これらはTat-(37-72)、Tat-(37-58)およびTat-(47-58)を包含する。これらのペプチドのすべては、細胞の中へのガラクトシダーゼ、RNアーゼおよびドメインIIIの吸収を促進するように思われた。これはTatの基本的領域であることが記載されていた。ポリ(L-リシン)またはポリ(L-アルギニン)を含有する複合体は、細胞により吸収されなかった。

【0009】

WO97/24445号には、アルブミンおよび成長ホルモンまたはそれらの変異型の融合タンパク質が開示されている。この明細書には、アルブミンの変異型が全長のアルブミンの膨張(oncotic)、リガンド結合および非免疫原的性質を有するであろうこと、そして成長ホルモンの変異型は非免疫原性を有しかつ成長ホルモンレセプターに結合し、それを活性化する能力を有するであろうことが記載されている。

【0010】

WO98/28427号には、Fc-OB融合タンパク質が開示されている。Fcは免疫グロブリンフラグメントであり、そしてOBはレプチンである。このような複合体はOB単独よりも安定であることが見出された。Fcフラグメントは378アミノ酸長さである。FcフラグメントをOBまたはOBフラグメントに直接的にまたはリンカーを介して結合することができる。

【0011】

他のアプローチは、ペプチドテイルを付加することによって、安定性および/または活性が増加したペプチドアナログを製造することを包含する。Greene他、J.Pharm.Exp.Therap. 277:1366-1375には、下記の種々のエンケファリンアナログプロドラッグを使用する研究結果が記載されている：[D-Pen²、D-Pen⁵]エンケファリン(DPDPE)および[D-Pen²、L-Cys⁵]エンケファリン(DPLCE)、特にDP LCE-Arg-Pro-Ala、DPDPE-Phe、DPLCE-Phe、DPDPE-Arg-Gly、DPLCE-Arg-Gly、DPDPE-Phe-Ala-NH-C₆H₁₃、DPDPE-Phe-Ala-CONH₂。DPDPE-Arg-Glyを除外した、アナログの大部分の半減期は親化合物よりも短い。第1372ページ、第2欄には、「理想的CNSターゲットプロドラッグは血清中で長い半減期を有し、そして脳中で短い半減期を有する」と記載されている。米国特許第4,724,229号には、効力があるアンタゴニスト活性を有するバソプレシンアンタゴニストが開示されており、これらのアンタゴニストは3つの塩基性アミノ酸、例えば、アルギニン、リシンまたはオルニチンを有するトリペプチド側鎖を有する。米国特許第4,542,124号には、バソプレシンアンタゴニストが開示されており、これらのアンタゴニストはジペプチド側鎖を有し、ジペプチド側鎖は2つのアミノ酸を有し、それらの1つは効力があるバソプレシンアンタゴニスト活性の根拠である。

【0012】

国際特許出願PCT/DK97/00376(Bjarne Due LarsenおよびArne Holm)には、薬理的に活性なペプチドのプロドラッグに記載されており、ここで薬理的に活性なペプチドはそのC末端においてリンカーを介してペプチド前配列にカップリングされており、リンカーは典型的には α -ヒドロキシカルボン酸である。これらの特別のペプチド誘導体は、タンパク質分解酵素、例えば、カルボキシペプチダ

ーゼA、ロイシンアミノペプチダーゼ、ペプシンAおよび α -キモトリプシンの存在下に延長された半減期を有することが見出された。さらに、PCT/DK97/00376には、ペプチド前配列をもつが、リンカーをもたない、4つの異なるペプチド(参照化合物として)、すなわち、DSIP-(Lys-Glu)₃、DSIP-(Glu)₆、Leu-エンケファリン-(Glu)₆およびLeu-エンケファリン-(Lys)₆が開示されている。

【0013】

薬理的に活性なペプチドと安定化タンパク質とを含有し、合成が比較的簡単であり、安定化ペプチドを除去しないときでさえ、その活性を保持し、血漿または血清中で安定であり、そして酵素分解に対して耐性である、ペプチド複合体が必要とされている。したがって、本発明の目的は、酵素分解に対して比較的安定である、薬理的に活性なペプチドと、安定化ペプチドを含むペプチド複合体を提供することである。

【0014】

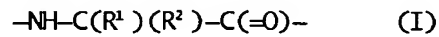
発明の要約

薬理的に活性なペプチドを、例えば、そのC末端、そのN末端またはそのC末端およびN末端において、適当な安定化ペプチド配列に複合させることによって、対応する遊離の薬理的に活性なペプチドに比較して、ペプチド複合体をプロテアーゼによる分解に対する感受性を有意に低くできることが今回驚くべきことには見出された。この作用の特定のモデルに拘束されないで、安定化ペプチド配列の存在は、水素結合に基づく、薬理的に活性なペプチドのある程度の構造化を誘発し、これによりランダム-コイルの立体配置のペプチドと対照的に、ペプチド複合体はプロテアーゼに対する感受性が低下されと考えられる。構造化の結果として、ペプチド複合体はプロテアーゼによる分解がはるかに困難になる。そのうえ、生ずるペプチド複合体はなお薬学的に活性である、すなわち、ペプチド複合体は遊離の薬理的に活性なペプチドの薬理的機能を発揮する能力を有する。

【0015】

こうして、第1の面において、本発明は、酵素的切断に対する傾向が減少した薬理的に活性なペプチド複合体またはその塩に関し、前記ペプチド複合体は下

記の成分を含む：薬理学的に活性なペプチド配列(X)およびXに共有結合した4~20アミノ酸残基の安定化ペプチド配列(Z)、ここで前記安定化ペプチド配列(Z)中の各アミノ酸残基はAla、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Met、Orn、および一般式Iのアミノ酸残基から成る群より独立に選択される：



式中、 R^1 および R^2 は水素、 C_{1-6} -アルキル、フェニル、およびフェニル-メチルから成る群より選択され、ここで C_{1-6} -アルキルはハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1~3個の置換基で置換されていてもよく、そしてフェニルおよびフェニル-メチルは C_{1-6} -アルキル、 C_{2-6} -アルケニル、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホノ、およびカルボキシから成る群より選択される1~3個の置換基で置換されていてもよい、あるいは R^1 および R^2 はそれらが結合する炭素原子と一緒にシクロペンチル、シクロヘキシル、またはシクロヘプチル環、例えば、2,4-ジアミノブタン酸(Dbu)および2,3-ジアミノプロパン酸(Dpr)を形成し；そして前記ペプチド複合体の半減期と対応する薬理学的に活性なペプチド配列Xの半減期との間の比は、約50mMのリン酸塩緩衝液中で約pH7.4、約37℃において、あるいは血漿または血清中でカルボキシペプチダーゼAまたはロイシナミノペプチダーゼで処理するとき、少なくとも約2、好ましくは少なくとも約3、例えば、少なくとも約5、より好ましくは少なくとも約7、例えば、少なくとも約9、例えば、少なくとも約10であるか、あるいは前記薬理学的に活性なペプチドが経口的に吸収されないとき、前記複合体は経口的に吸収される。

【0016】

1つの態様において、薬理学的に活性なペプチド複合体は、
 H-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu-(Lys-Glu)₃-OH、
 H-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu-(Glu)₆-OH、
 H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Glu)₆-OH、および
 H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Lys)₆-OH
 からなる群から選択されない。

【0017】

本発明は、また、前記薬理学的に活性なペプチド複合体と薬学上許容される担体とを含んでなる組成物、例えば、医薬組成物；療法において使用するための薬理学的に活性なペプチド複合体；障害を治療する方法；および療法において使用するための医薬組成物を製造するための薬理学的に活性なペプチド複合体の使用に関する。詳しくは、本発明は、下記の方法、使用および複合体に関する：エンケファリンと、ニューロンが疼痛衝撃を脊髄に伝達するのを抑制するために有効量のZとからなる複合体を、それを必要とする被検体に投与することからなる、ニューロンが疼痛衝撃を脊髄に伝達するのを抑制する方法、ならびに疼痛の治療において使用する医薬組成物を製造するための前記複合体の使用；成長ホルモン放出ホルモンまたは成長ホルモン放出ペプチドと、成長ホルモンの放出を刺激するために有効量のZを含んでなる複合体を、それを必要とする被検体に投与することからなる、下垂体からの成長ホルモンの放出を刺激する方法、ならびに成長ホルモンの放出を刺激するために使用する医薬組成物を製造するための前記複合体の使用；BMP-1（エリトロポイエチン擬態タンパク質1）と、ヘモグロビンのレベルを増加するために有効量のZとからなる複合体を、それを必要とする被検体に投与することからなる、ヘモグロビンのレベルを増加する方法、ならびにヘモグロビンのレベルを増加することによって貧血を治療するために使用する医薬組成物を製造するための前記複合体の使用；副甲状腺ホルモンと、骨の喪失を治療または予防するために有効量のZとからなる複合体をそれを必要とする被検体に投与することからなる、破骨（骨の吸収）活性と骨芽細胞活性との間の均衡を変更することによって骨の喪失を予防または治療する方法、ならびに骨粗しょう症の予防または治療において使用する医薬組成物を製造するための前記複合体の使用；グルコガン様ペプチド-1と、血糖レベルを減少するために有効量のZを含む複合体を、それを必要とする被検体に投与することを含む、血液グルコースレベルを減少する方法、ならびに糖尿病の治療において使用する医薬組成物を製造するための前記複合体の使用；デルタ睡眠誘発ペプチドと、痙攣を防止するために有効量のZとからなり、虚血間の神経保護剤として作用しかつオピオイドの解毒剤として作用する複合体、ならびに睡眠障害を治療において使用する医薬組成

物を製造するための前記複合体の使用；ゴナドトロピン放出ホルモンと、性ホルモンを調節するために有効量のZとを含む複合体を、それを必要とする被検体に投与することを含んでなる、性ホルモンの産生を調節する方法、ならびに性ホルモンのレベルの調節において使用する医薬組成物を製造するための前記複合体の使用。

【0018】

他の面において、本発明は、症状または障害の治療または予防のためのペプチド複合体を製造するための、本明細書において定義した、ペプチド複合体の使用に関し、ここでペプチド配列Xは、Zに結合しないとき、問題の症状または障害に関係するレセプター（またはレセプター系）と相互作用することができ、そしてZに結合しないとき、Xとレセプター（またはレセプター系）との間の相互作用は症状または障害に対して治療または予防作用を有する。

【0019】

また、本発明は、下記の工程からなる組換えDNA技術により前記薬理学的に活性なペプチド複合体を製造する方法に関する：(a)前記複合体をコードする核酸配列を宿主細胞の中に導入し、(b)前記宿主細胞を培養し、そして(c)前記複合体を培養物から単離するか、あるいは(a)前記複合体の産生を可能とする条件下に、前記複合体をコードする核酸配列を含む組換え宿主細胞を培養し、そして(b)前記複合体を培養物から単離する。

【0020】

本発明は、また、前記薬理学的に活性なペプチド複合体を製造する方法に関し、ここで薬理学的に活性なペプチドXが組換えDNA法を介して前記ペプチドを単離することにより得られるか、あるいは商業的源から得られる。次いで、固体支持体に結合されているか、あるいは固相合成法により製造されたZにXを結合させる。

【0021】

さらに、本発明は、薬理学的に活性なペプチド複合体を製造するための安定化ペプチド配列(Z)の使用に関する。

発明の詳細な説明

ペプチド複合体

本発明の関係において、用語「アミノ酸残基」は、Xと組み合わせて本明細書において使用するとき、任意の天然に存在するまたは合成の α 、 β 、または γ -アミノ酸（L-型またはD-型）ならびに側鎖修飾アミノ酸、例えば、芳香族環が、例えば、1またはそれ以上のハロゲン、スルホ基、ニトロ基およびその他でさらに置換されており、および／またはフェノール基がエステル基、およびその他に変換されている修飾チロシンを意味し、例えば、下記の文献に記載されているように、ペプチド化学の分野において知られている方法に従いアミノ酸側鎖が保護されている、側鎖が保護されたアミノ酸を包含する：M.BodanszkyおよびA.Bodanszky、"The Practice of Peptide Synthesis"、第2版、Springer-Verlag、1994、およびJ.Jones、"The Chemical Synthesis of Peptides"、Clarendon Press、1991。

【0022】

本発明の関係において、用語「薬理的に活性なペプチド配列」または「遊離ペプチド」は、Xに適用されるとき、それに共有結合した安定化配列Zを含まない、治療的または予防的に活性である、天然に存在するか、あるいは合成の、任意のペプチドまたはペプチド含有構造物を意味することを意図する。本明細書において定義するとき、ペプチド配列を疾患の状態、生理学的状態、症状または病因学適用の治療、寛解、または減衰のために、あるいはそれらの評価または診断のために使用できる場合、それは「療法的に活性」である。ペプチド配列を疾患の状態、生理学的状態、症状または病因学適用を予防するのに使用できる場合、それは「予防的に活性」である。薬理的に活性な物質は、また、生理学的または生物学的に活性である。薬理的活性はin vitro、in vivoまたはex vivoにおいて生理学的系または生物学的系に対するある物質の作用の測度であり、そして特定のペプチドまたは同様な生理学的機能をもつペプチドについてこの分野において知られている標準的in vitro、in vivoまたはex vivoアッセイを使用してアッセイすることができる。

【0023】

ペプチドは多数の方法、例えば、細胞から細胞への連絡において利用され、い

くつかのペプチドは自律系および中枢神経系の中に存在する。後者のペプチドのあるもの、および多数の他のペプチドは脈管および他の平滑筋に対して重要な作用を発揮する。好ましい態様において、Xは最大75アミノ酸残基(または最大75アミノ酸残基に対応する構造)を有する。あるいは、Xは最大65、60、55、53、50、45、40、35、30、25、20、20、15、または10アミノ酸残基から成り、そして少なくとも2、好ましい5、より好ましくは10アミノ酸残基から成る。

【0024】

本発明の関係において、薬理学的に活性なペプチド配列Xは、天然の形態で、C末端の遊離カルボン酸、例えば、Leu-エンケファリン(H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH)として存在するか、あるいは天然の形態で、C末端のアミド、例えば、オキシトシン(Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂)として存在するか、あるいは天然の形態で、C末端のエステルとして存在する、任意のペプチドであることができる。さらに、薬理学的に活性なペプチドは、また、他の特別の構造的特徴、例えば、インスリンの場合においてようにジサルファイド架橋を含有することができる。

【0025】

薬理学的に活性なペプチドは、下記のペプチドから成る群より選択することができる：エンケファリン、Leu-エンケファリン、Met-エンケファリン、アンギオテンシンI、アンギオテンシンII、バソプレシン、エンドセリン、血管作用性小腸ペプチド、ニューロテンシン、エンドルフィン、インスリン、グラミシジン、パラセルシン、デルタ睡眠誘発ペプチド、ゴナドトロピン放出ホルモン、ヒト副甲状腺ホルモン(1-34)、トランケートエリトロポイエチン(Wrighton 他、1996、Science 273:458-463に記載されている)、特にEMP-1、心房ナトリウム尿排泄増加性ペプチド(ANP、ANF)、ヒト脳ナトリウム尿排泄増加性ペプチド(hBNP)、セクロピン、カイネテンシン、ニューロフィシン、エラフィン、グアメリン、アトリオペプチンI、アトリオペプチンII、アトリオペプチンIII、デルトルフィンI、デルトルフィンII、バソトシン、ブラディキニン、ディノルフィン、ディノルフィンA、ディノルフィンB、成長ホルモン放出因子、成長ホルモン、成長ホルモン放出ペプチド、オキシトシン、カルシトニン、カルシトニン遺伝子関係ペプチド

、カルシトニン関係ペプチドII、成長ホルモン放出ペプチド、タキキニン、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、脳のナトリウム尿排泄増加性ポリペプチド、コールシストキニン、コルチコトロピン放出因子、ジアゼパム結合阻害フラグメント、FMRF-アミド、ガラニン、胃放出ペプチド、胃阻害ポリペプチド、ガストリン、ガストリン放出ペプチド、グルカゴン、グルカゴン様ペプチド-1、グルカゴン様ペプチド-2、LHRH、メラニン濃縮ホルモン、色素胞刺激ホルモン(MSH)、アルファ-MSH、モルヒネモジュレートペプチド、モチリン、ニューロキニンA、ニューロキニンB、ニューロメジンB、ニューロメジンC、ニューロメジンK、ニューロメジンN、ニューロメジンU、ニューロペプチドK、ニューロペプチドY、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)、膵臓ポリペプチド、ペプチドYY、ペプチドヒスチジン-メチオニンアミド(PHM)、セクレチン、ソマトスタチン、サブスタンスK、チロトロピン放出ホルモン(TRH)、キョトルフィン、メラノスタチン(MIF-1)、トロンボポイエチンアナログ、特にAF 12505(Ile-Glu-Gly-Pro-Thr-Leu-Arg-Gln-Trp-Leu-Ala-Ala-Arg-Ala)、インスリン成長因子I(57-70)(Ala-Leu-Leu-Glu-Thr-Tyr-Cys-Ala-Thr-Pro-Ala-Lys-Ser-Glu)、インスリン成長因子I(30-41)(Gly-Tyr-Gly-Ser-Ser-Ser-Arg-Arg-Ala-Pro-Gln-Thr)、インスリン成長因子I(24-41)(Tyr-Phe-Asn-Lys-Pro-Thr-Gly-Tyr-Gly-Ser-Ser-Ser-Arg-Arg-Ala-Pro-Gln-Thr)、インスリン成長因子II(33-40)(Ser-Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser-Arg)、インスリン成長[tyro]因子II(33-40)(Tyr-Ser-Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser-Arg)、インスリン成長因子II(69-84)(Asp-Val-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr-Val-Leu-Pro-Asp-Asn-Phe-Pro-Arg-Tyr)、成長ホルモン(GH)放出ペプチド-6(GHRP-6)(His-DTrp-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂)、ベーターインターロイキンI(163-171)(Val-Gln-Gly-Glu-Glu-Ser-Asn-Asp-Lys)、ベーターインターロイキンII(44-56)(Ile-Leu-Asn-Gly-Ile-Asn-Asn-Tyr-Lys-Asn-Pro-Lys-Leu)、インターロイキンII(60-70)(Leu-Thr-Phe-Lys-Phe-Tyr-Met-Pro-Lys-Lys-Ala)、エキセンジン-4(GLP-1アナログ)(His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂)、エキセンジン-3(GLP-1アナログ)(His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-G

lu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser)、[Cys(Acm)20、30]表皮成長因子(20-31)Cys(Acm)-Met-His-Ile-Glu-Ser-Leu-Asp-Ser-Thr-Cys(Acm)、ヒパリルジン(Hirulog)(D-Phe-Pro-Arg-Pro-(Gly)-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu)、ヒルログ-1 D-Phe-Pro-Arg-Pro-(Gly)4-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Tyr-Leu、C型ナトリウム尿排泄増加性ペプチド(1-53)(CNP)(Asp-Leu-Arg-Val-Asp-Thr-Lys-Ser-Arg-Ala-Ala-Trp-Ala-Arg-Leu-Leu-Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-Ala-Asn-Lys-Lys-Gly-Leu-Ser-Lys-Gly-Cys-Phe-Gly-Leu-Lys-Leu-Asp-Arg-Ile-Gly-Ser-Met-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys;ジサルファイド架橋:Cys37-Cys53)、[ミニANP](Met-Cys-His-シクロヘキシルAla-Gly-Gly-Arg-Met-Asp-Arg-Ile-Ser-Cys-Tyr-Arg、ジサルファイド架橋cys2-cys13)、メラノタン-II(また、MT-IIとして知られている、アルファ-MSH4-10-NH₂、またはAc-Nle4-Asp5-His6-D-Phe7-Arg8-Trp9-Lys10)、チモンアルファ1(CTA1)(Ac-Ser-Asp-Ala-Ala-Val-Asp-Thr-Ser-Ser-Glu-Ile-Thr-Thr-Lys-Asp-Leu-Lys-Glu-Lys-Lys-Glu-Val-Val-Glu-Glu-Ala-Glu-Asn)、オルニプレシン(また、8-オルニチン-バソプレシン(POR-8)、[Phe2、Ile3、Orn8]バソプレシンとして知られている)、Cys-Phe-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Orn-Gly-NH₂、ジサルファイド架橋:Cys1-Cys6)、オクトレオチド(201-995)(DPhe-Cys-Phe-DTrp-Lys-Thr-Cys-Thr-オール;ジサルファイド架橋:Cys2-Cys7)、エプチフィバチド(INTEGRILIN)、カルシトニン遺伝子関係ペプチド(CGRP)(Ala-Cys-Asp-Thr-Ala-Thr-Cys-Val-Thr-His-Arg-Leu-Ala-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-Gly-Val-Val-Lys-Asn-Asn-Phe-Val-Pro-Thr-Asn-Val-Gly-Ser-Lys-Ala-Phe-NH₂;ジサルファイド架橋:Cys2-Cys7)、エンドモルフィン-1 Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂;エンドモルフィン-2 Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂;ノシセピチン(また、オルファニンFQ、Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Glnとして知られている)、アンギオテンシノゲン(1-13)(Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His)、アドレノモジュリン(1-12)(Tyr-Arg-Gln-Ser-Met-Asn-Asn-Phe-Gln-Gly-Leu-Arg)、抗不整脈性ペプチド(AAP)(Gly-Pro-Hyp-Gly-Ala-Gly)、アンタゴニストG(Arg-DTrp-(nMe)Phe-DTrp-Leu-Met-NH₂)、インドリシジン(Ile-Leu-Pro-Trp-Lys-Trp-Pro-Trp-Trp-Pro-Trp-Arg-Arg-NH₂)、オステオカルシン(37-49)(Gly-Phe-

Gln-Glu-Ala-Tyr-Arg-Arg-Phe-Tyr-Gly-Pro-Val)、コルチスタチン29(1-13)(Gln-Glu-Arg-Pro-Pro-Leu-Gln-Gln-Pro-Pro-His-Arg-Asp)、コルチスタチン14 Pro-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Ser-Ser-Cys-Lys;ジサルファイド架橋:Cys2-Cys13、PD-145065(Ac-D-Bhg-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp)、PD-142893(Ac-D-Dip-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp)、フィブリノゲン結合インヒビターペプチド(His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val)、レプチン(93-105)(Asn-Val-Ile-Gln-Ile-Ser-Asn-Asp-Leu-Glu-Asn-Leu-Arg)、GR 83074(Boc-Arg-Ala-DTrp-Phe-DPro-Pro-Nle-NH₂)、Tyr-W-MIF-1(Tyr-Pro-Trp-Gly-NH₂)、副甲状腺ホルモン関係ペプチド(107-111)(Thr-Arg-Ser-Ala-Trp)、アンギオテンシノゲン(1-14)Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Asn、ロイペプチン(Ac-Leu-Leu-Arg-CHO)、およびそれらの任意の修飾またはトランケートアナログ。

【0026】

多数の薬理学的に活性なペプチドは、また、修飾またはトランケート型で存在するとき、所望の薬学的作用を発揮することはよく知られている。例えば、インスリンの場合において、ブタインスリンは、ただ1つのアミノ酸残基だけヒトインスリンと異なり、ブタインスリン中のB30アミノ酸はAlaであり、そしてヒトインスリン中のB30アミノ酸はThrである。この差にかかわらず、ブタインスリンは多年にわたって糖尿病の有効な薬剤として使用されてきている。同様な方法において、ヘプタデカペプチドブタガストリンIにおける活性について必須な特徴のすべてはC末端のテトラペプチドの中に含有され、そしてニューロテンシンの本質的にすべての薬学的作用はC末端のヘキサペプチドに関係づけられることが見出された。さらに、1またはそれ以上のアミド結合が修飾されている、例えば、還元されている、薬理学的に活性なペプチドは、同様な、または増強された薬学的活性をしばしば示す；例えば、ソマトスタチンのCys²ψ[CH₂NH]Tyr³アナログは、ソマトスタチンそれ自体よりも、なおいっそう効力がある成長ホルモン放出因子であることが見出され、そしてまた、アンギオテンシンの移行状態のアナログLeu¹⁰[CH(OH)CH₂]Val¹¹はアスパラギン酸プロテアーゼのレニンに対して強い阻害作用を示すことが見出された。こうして、用語「その修飾またはトランケートアナログ」は、このようなペプチドが自然ペプチドの配列中の1または

それ以上のアミノ酸残基を変化または欠失させることによって修飾されることを意味し、個々のアミノ酸残基中の側鎖、立体化学、および主鎖中の修飾、例えば、1またはそれ以上のペプチド結合の $(-C(=O)-NH-)$ 、例えば、還元された形態、例えば、 $(-CH(OH)-N-)$ 、 $(-CH_2-N-)$ 、および他のペプチド結合擬態、例えば、 $(-C(=O)-N(CH_3)-)$ 、 $(-C(=O)-O-)$ 、 $(-C(=O)-CH_2-)$ 、 $(-CH=CH-)$ 、 $(-PO_2-NH-)$ 、 $(SO-CH_2-)$ 、 (SO_2-N-) 、およびその他への変化を包含する。

【0027】

問題のペプチド配列Xは、本発明を完全に利用するために、酵素分解に対して感受性である少なくとも1つのペプチド結合(好ましくは少なくとも2つのペプチド結合(これは当然ジペプチドに適用されない))を含むことが好ましいことを理解すべきである。

本発明の関係において、用語「 C_{1-6} -アルキル」は、単独でまたは他の基と組み合わせて使用するとき、1~6個の炭素原子を有する、直鎖状、分枝鎖状もしくは環状の飽和炭化水素基、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、*s*-ブチル、*t*-ブチル、*n*-ペンチル、*n*-ヘキシル、シクロヘキシルおよびその他を意味する。

【0028】

本発明の関係において、用語「 C_{2-6} -アルケニル」は、直鎖状、分枝鎖状もしくは環状でありかつ1またはそれ以上の二重結合を含有することができる、2~6個の炭素原子を有する炭化水素基、例えば、ビニル、アリル、1-ブテニル、2-ブテニル、イソブテニル、1-ペンテニル、2-ペンテニル、4-ペンテニル、3-メチル-1-ブテニル、2-ヘキセニル、5-ヘキセニル、シクロヘキセニル、2,3-ジメチル-2-ブテニルおよびその他を表示し、これらはシスおよび/またはトランス立体配置であることができる。

【0029】

用語「アリール」は、芳香族、炭素環式基、例えば、フェニルまたはナフチルを意味することを意図する。

用語「ヘテロアリール」は、窒素、酸素および硫黄から選択される1~4個のヘテロ原子を含有する5または6員の芳香族単環の複素環式基、例えば、ピロリル、

フリル、ピラゾリル、イミダゾリル、オキサゾリル、イソキサゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、オキサジアゾリル、オキサゾリル、イソキサゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、トリアゾリル、ピリジル、および窒素、酸素および硫黄から選択される1~6個のヘテロ原子を含む芳香族二環式複素環式基、例えば、キノリニルを包含する。

【0030】

用語「ハロゲン」は、フッ素、塩素、臭素、およびヨウ素を包含する。

ペプチド配列Zは、化合物をプロテアーゼによる分解に対していっそう安定とする、分子の中へのある種の二次構造の導入および／または安定化に関するペプチド複合体の部分である。このような安定化構造因子を導入するために、Zは少なくとも4アミノ酸残基を含むことを必要とすると考えられる。他方において、また、約20アミノ酸残基より多い配列は安定性をそれ以上の改良しないであろうと考えられる。こうして、Zは典型的には4~20アミノ酸残基、例えば、4~15アミノ酸残基の範囲、より好ましくは4~10、特に4~7アミノ酸残基の範囲、例えば、4、5、6または7アミノ酸残基のペプチド配列である。ZがXと複合しているとき、前記ペプチド複合体の半減期は、約50mMのリン酸塩緩衝液中で約pH7.4、約37℃において、あるいは血漿または血清中でカルボキシペプチダーゼAまたはロイシンアミノペプチダーゼで処理するとき、Zと複合しないときのXの半減期よりも、少なくとも約2、好ましくは少なくとも約3、例えば、少なくとも約5、より好ましくは少なくとも約7、例えば、少なくとも約9、例えば、少なくとも約10多い。さらに、薬理的に活性なペプチドXが経口的に吸収されないとき、複合体は経口的に吸収される。

【0031】

ペプチド配列Z中のアミノ酸残基の各々は、Ala、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Met、Orn、および本明細書において定義した一般式Iのアミノ酸、例えば、ジアミノブタン酸またはジアミノプロパン酸から独立して選択される。好ましくは、アミノ酸残基はSer、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Orn、およびMet、より好ましくはGlu、Lys、およびMet、特にLysから選択される。前述のアミノ酸はD-またはL-立体配置を有すること

ができるが、好ましくは前述のアミノ酸はL-立体配置を有する。薬理学的に活性なペプチド配列Xは通常もっぱらL-アミノ酸から成るが、全体のペプチド複合体の可能な安定化らせん構造を保存するために、D-アミノ酸のみから成るか、あるいは主としてD-アミノ酸から成るペプチド配列Zに比較して、L-アミノ酸のみから成るか、あるいは主としてL-アミノ酸から成るペプチド配列Zは有利であることを期待しなくてはならない。さらに、生物分解に対するD-ペプチドおよびD-アミノ酸の耐性のために、D-アミノ酸のみから成るか、あるいは主としてD-アミノ酸から成るペプチド配列Zは毒物学的作用を発揮することができることが予想される。

【0032】

こうして、ペプチド配列Zの例示的な例は次の通りである：

Lys-Lys-Lys-Lys、Xaa-Lys-Lys-Lys、Lys-Xaa-Lys-Lys、Lys-Lys-Xaa-Lys、Lys-Lys-Lys-Xaa、Xaa-Xaa-Lys-Lys、Xaa-Lys-Xaa-Lys、Xaa-Lys-Lys-Xaa、Lys-Xaa-Xaa-Lys、Lys-Xaa-Lys-Xaa、Lys-Lys-Xaa-Xaa、Xaa-Xaa-Xaa-Lys、Xaa-Xaa-Lys-Xaa、Xaa-Lys-Xaa-Xaa、Lys-Xaa-Xaa-Xaa、Xaa-Xaa-Xaa-Xaa、Lys-Lys-Lys-Lys-Lys、Xaa-Lys-Lys-Lys-Lys、Lys-Xaa-Lys-Lys-Lys、Lys-Lys-Xaa-Lys-Lys、Lys-Lys-Lys-Xaa-Lys、Lys-Lys-Lys-Lys-Xaa、Xaa-Xaa-Lys-Lys-Lys、Xaa-Lys-Xaa-Lys-Lys、Xaa-Lys-Lys-Xaa-Lys、Xaa-Lys-Lys-Lys-Xaa、Lys-Xaa-Xaa-Lys-Lys、Lys-Xaa-Lys-Xaa-Lys、Lys-Lys-Xaa-Xaa-Lys、Lys-Lys-Xaa-Lys-Xaa、Lys-Lys-Lys-Xaa-Xaa、Lys-Lys-Xaa-Xaa-Xaa、Lys-Xaa-Lys-Xaa-Xaa、Lys-Xaa-Xaa-Lys-Xaa、Lys-Xaa-Xaa-Xaa-Lys、Xaa-Lys-Lys-Xaa-Xaa、Xaa-Lys-Xaa-Xaa-Lys、Lys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa、Xaa-Xaa-Lys-Xaa-Xaa、Xaa-Xaa-Xaa-Lys-Xaa、Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Lys、Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa、Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys、Xaa-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys、Lys-Xaa-Lys-Lys-Lys-Lys、Lys-Lys-Xaa-Lys-Lys-Lys、Lys-Lys-Lys-Xaa-Lys-Lys、Lys-Lys-Lys-Lys-Xaa-Lys、Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Xaa、Xaa-Xaa-Lys-Lys-Lys-Lys、Xaa-Lys-Xaa-Lys-Lys-Lys、Xaa-Lys-Lys-Xaa-Lys-Lys、Xaa-Lys-Lys-Lys-Xaa-Lys、Xaa-Lys-Lys-Lys-Lys-Xaa、Lys-Xaa-Lys-Lys-Lys-Lys、Lys-Xaa-Lys-Lys-Xaa-Lys

、Lys-Xaa-Lys-Lys-Lys-Xaa、Lys-Lys-Xaa-Xaa-Lys-Lys、Lys-Lys-Xaa-Lys-Xaa-Lys、Lys-Lys-Xaa-Lys-Lys-Xaa、Lys-Lys-Lys-Xaa-Xaa-Lys、Lys-Lys-Lys-Xaa-Lys-Xaa、Lys-Lys-Lys-Lys-Xaa-Xaa、Xaa-Xaa-Xaa-Lys-Lys-Lys、Xaa-Xaa-Lys-Xaa-Lys-Lys、Xaa-Xaa-Lys-Lys-Xaa-Lys、Xaa-Xaa-Lys-Lys-Lys-Xaa、Xaa-Lys-Xaa-Xaa-Lys-Lys、Xaa-Lys-Xaa-Lys-Xaa-Lys、Xaa-Lys-Xaa-Lys-Lys-Xaa、Xaa-Lys-Lys-Xaa-Xaa-Lys、Xaa-Lys-Lys-Xaa-Lys-Xaa、Xaa-Lys-Lys-Lys-Xaa-Xaa、Lys-Lys-Lys-Xaa-Xaa-Xaa、Lys-Lys-Xaa-Lys-Xaa-Xaa、Lys-Lys-Xaa-Xaa-Lys-Xaa、Lys-Lys-Lys-Xaa-Xaa-Xaa-Lys、Lys-Xaa-Lys-Lys-Xaa-Xaa、Lys-Xaa-Lys-Xaa-Lys-Xaa、Lys-Xaa-Lys-Xaa-Xaa-Lys、Lys-Xaa-Xaa-Lys-Lys-Xaa、Lys-Xaa-Xaa-Lys-Xaa-Lys、Lys-Xaa-Xaa-Xaa-Lys-Lys、Lys-Lys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa、Lys-Xaa-Lys-Xaa-Xaa-Xaa、Lys-Xaa-Xaa-Lys-Xaa-Xaa、Lys-Xaa-Xaa-Xaa-Lys-Xaa、Lys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Lys、Lys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Lys、Xaa-Lys-Lys-Xaa-Xaa-Xaa、Xaa-Lys-Xaa-Lys-Xaa-Xaa、Xaa-Lys-Xaa-Xaa-Lys-Xaa、Xaa-Lys-Xaa-Xaa-Xaa-Lys、Xaa-Xaa-Lys-Lys-Xaa-Xaa、Xaa-Xaa-Lys-Lys-Xaa、Xaa-Xaa-Lys-Xaa-Xaa-Lys、Xaa-Xaa-Xaa-Lys-Lys-Xaa、Xaa-Xaa-Xaa-Lys-Xaa-Lys、Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Lys-Lys、Lys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa、Xaa-Lys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa、Xaa-Xaa-Lys-Xaa-Xaa-Xaa、Xaa-Xaa-Xaa-Lys-Xaa-Xaa、Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Lys-Xaa、Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Lys、またはXaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa、ここで各XaaはAla、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Arg、His、Met、Orn、および本明細書において定義した一般式Iのアミノ酸、例えば、DbuまたはDprから成る群より独立して選択される。

【0033】

1つの態様において、安定化ペプチド配列Zは、pH7において約0～+15の範囲、好ましくは約0～+10の範囲、例えば、約0～+8、特に約0～+6、例えば、約0～+4、特に約0～+3の全体の電荷を有する。特定の理論に制限されないで、安定化ペプチド配列Zにおける負でない電荷は、また、細胞外部位に負電位を有する細胞膜へのかつ細胞膜上への輸送をある程度促進することができることが考えられる。こうして、安定化ペプチド配列Z上に負でない電荷を保証するために、ペプチド配列Zは好ましくは少なくとも1つのLysアミノ酸残基、より好ましくは少なくとも2つのLysアミノ酸残基、例えば、少なくとも3つのLysアミノ酸残基、特

【 0 0 3 4 】

【 0 0 3 5 】

[illegible]

ys-Xaa²-Lys、Xaa¹-Xaa²-Lys-Xaa²、Xaa¹-Xaa²-Lys-Xaa²-Lys、Xaa¹-Xaa¹-Lys-Xaa²-Lys-Xaa²、Lys-Xaa²-Lys-Xaa¹、Lys-Xaa²-Lys-Xaa²-Xaa¹、Lys-Xaa²-Lys-Xaa²-Lys-Xaa¹、Xaa²-Lys-Xaa²-Xaa¹、Xaa²-Lys-Xaa²-Lys-Xaa¹、Xaa²-Lys-Xaa¹-Lys-Xaa²-Xaa¹、およびその他、ここでXおよびYは約1~4の範囲の整数であり、ただしX+Yは最大5であり、そしてXaa¹ およびXaa² はAla、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Arg、His、Met、Orn、2,3-ジアミノプロパン酸、2,4-ジアミノブタン酸および本明細書において定義した式Iのアミノ酸から成る群より独立して選択される。

【0036】

ペプチド配列Zに関して、ペプチド配列Zの構成成分として記載された特定のアミノ酸残基、すなわち、Ala、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Met、Orn、2,3-ジアミノプロパン酸(Dpr)、2,4-ジアミノブタン酸(DbU)および本明細書において定義した式Iのアミノ酸残基は、 α -炭素原子の回りの立体的配置のために、そして多分特定の電子的立体配置のために、らせん様構造に参加するか、あるいはさらにそれを安定化または開始する、ある種の選択を有するアミノ酸残基であることが考えられる。Chou-Fasmanのアプローチ(Chou, P. Y. および Fasman, G. D., Ann. Rev. Biochem. 47:251-276(1978))は、特定のアミノ酸残基が α -らせん構造(「コンフォメーションパラメーター P_{α} 」として表される)に関係する可能性を定量する(実験的に)ことの1つの試みである。しかしながら、ChouおよびFasmanの研究および関係する研究が示すように、低いパラメーター P_{α} を有するアミノ酸残基は α -らせんの中に見出すことができるが、もちろん、アミノ酸残基は高い P_{α} をしばしばもつことはない。こうして、ペプチド配列Zにおいて、それはZの構成成分として上記において選択されたアミノ酸残基の中に入らないアミノ酸残基を小さい比率で含むことができると考えられ、そして、なお、選択されたアミノ酸残基がこのような別のアミノ酸残基の陰性または中性の作用を補償すると考えられる所望の効果をペプチド配列Zから得ることができると考えられる。

【0037】

特定の態様において、Zは(DbU)_nまたは(Dpr)_nであり、ここでnは約4~15の範

冊、好ましくは約4~10の範囲、例えば、約4~8の範囲、特に約4~6の範囲の整数である。最も特定の態様において、ZはDpr₆である。

こうして、本発明の範囲内に入る態様において、Zの構成成分として好ましいアミノ酸残基の中に入らないアミノ酸残基を25%まで現実を含むことが实际的であり得る。〔「25%」〕とは、アミノ酸残基の数について言及する、すなわち、別のアミノ酸残基はジペプチドまたはトリペプチドにおいて許されず、1つまでの別のアミノ酸残基はテトラペプチド、ペンタペプチド、ヘキサペプチド、およびヘプタペプチドにおいて許され、2つまでの別のアミノ酸残基はオクタペプチドにおいて許される、およびその他)。このような別のアミノ酸残基はVal、Ile、Pro、Phe、Gly、Trp、ならびにN-メチルアミノ酸残基から選択することができるが、好ましくはPro、GlyおよびN-メチルアミノ酸残基ではない。そのうえ、当業者にとって明らかのようにペプチド複合体の合成と関連して使用される固体支持体物質の型および切断条件に依存して、ZのC末端は遊離酸、アミド、またはエステル、例えば、メチルエステル、エチルエステル、ベンジルエステル、およびその他の形態であることができる。N末端は遊離アミンまたはラクタムの形態であることができる。

【0038】

安定化ペプチド配列Zを薬理的に活性なペプチド配列XのC末端またはN末端に結合させるか、あるいは2つのペプチド配列をXのC末端またはN末端の両方に結合させることができる。自然の薬理的に活性なペプチドXが遊離C末端カルボン酸を有する場合(Leu-エンケファリン-の場合におけるように)、ペプチド配列ZをペプチドXのC末端あるいはペプチドXのN末端のいずれかに結合させるか、あるいはXのC末端およびN末端の両方に結合させることができる。あるいは、Zをリシン、ヒスチジンまたはアルギニンの側鎖上の窒素原子に結合させるか、あるいはペプチド配列X内のどこかのグルタミン酸またはアスパラギン酸の側鎖上のカルボニル官能基に結合させることができる。

【0039】

1つの態様において、Zを配列内のXに結合させかつXのN末端および/またはC末端に結合させることができる。配列をペプチド配列ZにそのC末端、そのC末端、または両方に、あるいはペプチド配列X内に結合させるかどうかは、特定のペプ

チドX、および前記ペプチドXが発揮する薬学的機能に依存し、そして当業者により容易に決定されるであろう。ある場合において、生物学的活性または生理学的活性は、薬理学的に活性なペプチドXのC末端における負電荷にもっぱらに依存することがある。したがって、このような場合において、Xの活性および結局薬理学的作用は、薬理学的に活性なペプチドXのC末端上の負電荷をブロックすることによって障害されることがあり、したがって、ペプチド配列ZをペプチドXのN末端に結合させることが好都合であろう。

【0040】

同様な方法において、薬理学的に活性なペプチドXがC末端アミド(例えば、オキシトシン)としてその自然形態で存在する場合、アミド基が重要な薬理学的機能を有すると考えられるとき、安定化ペプチド配列ZをペプチドXのN末端に結合することは好都合であろう。こうして、遊離C末端カルボキシル基を有する薬理学的に活性なペプチドXに対応するペプチド配列ならびにC末端アミドまたはエステル基を有する薬理学的に活性なペプチドXに対応するペプチドを、本発明のペプチド複合体において使用することができる。しかしながら、本発明の興味ある態様において、ペプチド配列Zを薬理学的に活性なペプチドXのC末端に結合させる(自然形態のXは遊離カルボン酸、アミドまたはエステルであるかどうかにかかわらず)。

【0041】

本発明のペプチド複合体は、また、その塩の形態であることができることを理解すべきである。塩は薬学上許容される塩、例えば、酸付加塩および塩基性塩を包含する。酸付加塩の例は、塩酸塩、ナトリウム塩、カルシウム塩、カリウム塩、およびその他である。塩基性塩の例は、カチオンがアルカリ金属、例えば、ナトリウムおよびカリウム、アルカリ土類金属、例えば、カルシウム、およびアンモニウムイオン $N(R^3)_3$ (R^4)から選択される塩であり、ここで R^3 および R^4 は置換されていてもよい C_{1-6} -アルキル、置換されていてもよい C_{2-6} -アルケニル、置換されていてもよいアリール、または置換されていてもよいヘテロアリールを独立して表示する。薬学上許容される塩の他の例は、例えば、下記の文献に記載されている塩である：“Remington's Pharmaceutical Sciences”、第17版、Alfonso

R.Gennaro(編)、Mark Publishing Company、米国ペンシルベニア州イーストン、1985、およびより最近の版、およびEncyclopedia of Pharmaceutical Technology。

【0042】

最も特定の態様において、ペプチド複合体は下記のものから成る群より選択される：

H-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-Lys₆-NH₂ (GHRH(1-44)(ヒト)-Lys₆-NH₂)；
 H-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-Glu₆-NH₂ (GHRH(1-44)(ヒト)-Glu₆-NH₂)；
 H-Lys₆-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-OH(Lys₆-PTH(1-34)(ヒト)-OH)；

最も特定の態様において、ペプチド複合体は下記のものから成る群より選択される：

H-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-Lys₆-NH₂ (GHRH(1-44)(ヒト)-Lys₆-NH₂) (配列番号:88)；
 H-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-Glu₆-NH₂ (GHRH(1-44)(ヒト)-Glu₆-NH₂) (配列番号:89)；
 H-Lys₆-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-OH(Lys₆-PTH(1-34)(ヒト)-OH) (配列番号:90)；
 H-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Me

t-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-Lys₆-OH(PTH(1-34)(ヒト)-Lys₆-OH)(配列番号:91);

H-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Lys₆-OH(GLP-1-(7-36)(ヒト)-Lys₆-OH)(配列番号:92);

【0043】

【化2】

H-Gly-Gly-Thr-Tyr-Ser-Cys(Acm)-His-Phe-Gly-Pro-Leu-Thr-Trp-Val-Cys(Acm)-Lys-Pro-Gln-Gly-Gly-Lys₆-OH (EMP-1-Lys₆-OH)(配列番号 93);

H-Lys₆-Gly-Gly-Thr-Tyr-Ser-Cys(Acm)-His-Phe-Gly-Pro-Leu-Thr-Trp-Val-Cys(Acm)-Lys-Pro-Gln-Gly-Gly-OH (Lys₆-EMP-1-OH)(配列番号 94);

【0044】

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys₆-OH(H-Leu-エンケファリン-Lys₆);

H-Lys₆-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys₆-OH(H-Lys₆-Leu-エンケファリン-Lys₆-OH);

Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-(Lys)₆-OH(GnRH-Lys₆-OH);

Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-(Lys-Glu)₃-OH(GnRH-(Lys-Glu)₃-OH);および

H-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-(Lys-Glu)₃-OH(PTH1-34ヒト-(Lys-Glu)₃-OH)。

【0045】

上に説明したように、Zはプロテアーゼを触媒とする分解に対して化合物をいっそう安定とする、分子の中にある種の構造を導入するためのペプチド複合体である。したがって、本発明は、また、上記において定義した薬理的に活性なペプチド複合体を製造するために、上記において定義した安定化ペプチド配列(Z)を使用することに関する。

【0046】

前述したように、プロテアーゼ、例えば、キモトリプシン、トリプシン、カルボキシペプチダーゼA、ペプシン、ロイシンアミノペプチダーゼ、およびその他による急速な生物分解のために、薬理的に活性なペプチドの投与経路はむしろ制限されてきている。こうして、要求される目的に適当な薬理的に活性なペプチド複合体に対する要件は、一方において、ペプチド複合体はプロテアーゼを触媒とする加水分解に対して少なくともある程度抵抗することができること、他方において、ペプチド複合体は、なお少なくともある程度、遊離ペプチドXにより通常提供される所望の薬学的作用を発揮できることである。

【0047】

これを基準として、所望の性質を発揮するペプチド複合体の能力を評価する *in vitro* アッセイが開発された。このようなアッセイ、ならびにそれらの結果を実施例において説明する。これらの型のアッセイはきわめてすぐれた予備的試験であり、当業者はこれらの試験を容易に実施して、本明細書に開示する原理に従い製造される所定のペプチド複合体の適当性を評価することができる。

【0048】

こうして、プロテアーゼを触媒とする加水分解に対して抵抗する本発明の薬理的に活性なペプチド複合体の傾向は、実施例に示す *in vitro* 酵素アッセイにより直接的に測定することができる。分解に抵抗するペプチド複合体の傾向は、例えば、偽一次速度定数および／または前記ペプチド複合体の半減期として表すことができ、次いでこれらを遊離ペプチドXの対応する値と比較することができる。

【0049】

本明細書において提供される実施例から明らかなように、本発明に従い問題のペプチド(X)を安定化ペプチド配列(Z)に複合させることによって、薬理的に活性なペプチド配列の半減期($T_{1/2}$)を顕著に増加させることができることが見出された。

こうして、本発明の好ましい態様において、本明細書において定義した「酵素溶液中の加水分解試験」における問題のペプチド複合体の半減期と、「酵素溶液中の加水分解試験」における対応する遊離ペプチド(X)の半減期との間の比は、

カルボキシペプチダーゼAまたはロイシンアミノペプチダーゼを使用するとき、少なくとも約2、好ましくは少なくとも約3、例えば、少なくとも約5、より好ましくは少なくとも約10、特に少なくとも約20、例えば、少なくとも約50、例えば、少なくとも約100である。

【0050】

プロテアーゼのカルボキシペプチダーゼAおよびロイシンアミノペプチダーゼは本明細書に記載する試験において使用されたが、また、他のエンドペプチダーゼまたはエキソペプチダーゼ、例えば、トリプシン、またはこのようなペプチダーゼの混合物、例えば、人工胃液を使用する同一のまたは類似する試験系において、プロテアーゼ分解に抵抗するペプチド複合体の能力を試験できることが考えられる。

【0051】

さらに、所望の薬学的作用を発揮する本発明のペプチド複合体の能力を、本明細書に記載する *in vitro* および *in vivo* アッセイ手法において試験した。こうして、好ましいペプチド複合体は、多少の薬学的作用を示し、好ましくは同様な薬学的作用を示し、ある場合において薬理学的に活性な遊離ペプチド(∞)に比較して増強された薬学的作用をさえ示す、このような複合体である。

【0052】

本明細書において提供された実施例から理解されるように、本発明のペプチド複合体は胃腸環境の中に存在する種々のタンパク質分解バリアーに「生き残る」ことができる。こうして、本明細書中の実施例において証明されているように、薬理学的に活性なペプチド複合体を投与する(例えば、経口的に)することができ、この時投与されたペプチド複合体のある画分(例えば、投与された総量のペプチド複合体の少なくとも1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはさらに少なくとも99%)は血流の中に入ることができる。したがって、本発明の特に重要なペプチド複合体は、薬理学的に有効な投与量(これはもちろん治療すべき病気または障害および前記治療の実際の薬学的作用またはペプチド複合体に依存する)で経口的に投与するとき、少なくとも約0.1分~24時間、0.1分

～5時間の期間後、例えば、約0.5分～3時間、特に約1分～2時間の期間後、好ましくは約3分～1時間、例えば、約5分～1時間、特に約10分～1時間、1分～16時間、0.1分～12時間の期間後、治療的または予防的に有効濃度で血流中に存在するような化合物である。前記ペプチド複合体の治療的に関係する濃度は、もちろん、治療すべき病気または障害に依存し、そして治療的に関係する濃度は当業者に知られている。

【0053】

そのうえ、本発明のペプチド複合体は、例えば、血清および血漿中で、驚くべきほどに安定である。こうして、本発明の好ましいペプチド複合体は、37℃において少なくとも約10分、例えば、少なくとも約15分、例えば、少なくとも約0.5時間、好ましくは少なくとも約1時間、例えば、少なくとも約2時間、例えば、少なくとも約3時間、より好ましくは少なくとも約4時間、例えば、少なくとも約5時間、例えば、少なくとも約6時間、特に少なくとも約12時間、例えば、少なくとも約24時間、例えば、少なくとも約36時間のヒトまたはマウスの血清または血漿（必要に応じてあるpH、例えば、pH7.4を保証するために緩衝剤を含有する）中の半減期を有するような化合物である。血漿または血清中の前記ペプチド複合体の半減期および対応する薬理学的に活性なペプチド配列Xの半減期の比が、少なくとも約2、好ましくは少なくとも約3、例えば、少なくとも約5、より好ましくは少なくとも約7、例えば、少なくとも約9、例えば、少なくとも約10である場合、特に好ましい。

【0054】

組成物

本発明は、また、上記において定義した薬理学的に活性なペプチド複合体と、薬学上許容される担体とを含んでなる組成物に関する。このような組成物は、経口、皮下、非経口（静脈内、腹腔内）、筋肉内、経直腸、硬膜上、気管内、鼻内、皮膚、経膈、経頬、眼内、直接的脳または肺投与に適合した形態で、好ましくは経口投与に適合した形態であることができ、そしてこのような組成物はこの分野においてよく知られている方法、例えば、下記の文献に記載されている方法により製造することができる：“Remington’s Pharmaceutical Sciences”、第17

版、Alfonso R.Gennaro(編)、Mark Publishing Company、米国ペンシルベニア州イーストン、1985、および“Drugs and the Pharmaceutical Sciences” series、Marcel Dekker。組成物は、慣用の形態、例えば、カプセル剤、錠剤、エロゾル、溶液、懸濁液または局所適用の形態であることができる。

【0055】

使用する薬学上の担体または希釈剤は、慣用の固体または液状担体であることができる。固体状担体の例は、ラクトース、白陶土、スクロース、シクロデキストリン、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アカシアゴム、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはセルロースの低級エーテルである。液状担体の例は、シロップ、落花生油、オリーブ油、リン脂質、脂肪酸、脂肪酸アミン、ポリオキシエチレンおよび水である。

【0056】

同様に、担体または希釈剤は、この分野において知られている持続放出性物質、例えば、グリセリルモノステアレートまたはグリセリルジステアレート単独またはそれとワックスとの組合わせを包含することができる。

固体状担体を経口投与に使用する場合、調製物を錠剤化し、粉末またはペレットの形態でカプセルの中に入れるか、あるいはトローチ剤またはロゼンジの形態であることができる。固体状担体の量は広く変化するが、通常約25mg～約1gであろう。

【0057】

慣用の錠剤化技術により製造できる典型的な錠剤は下記の成分を含有することができる：コア：活性化合物(遊離化合物またはその塩として)100mg；コロイド状二酸化ケイ素(Aersosil)1.5mg；セルロース、微結晶(Avice1)70mg；変性セルロースガム(Ac-Di-Sol)7.5mg；ステアリン酸マグネシウム。コーティング：HPMC ほぼ9mg；*Mywacett 9-40T ほぼ0.9mg；*アセチル化モノグリセリド、フィルムコーティングの可塑剤として使用する。

【0058】

液状担体を使用する場合、調製物はシロップ、エマルジョン、軟質ゼラチンカプセルまたは無菌の注射可能な液体、例えば、水性または非水性の液状懸濁液ま

たは溶液の形態であることができる。

経鼻投与のために、調製物はエロゾル適用のための液状担体、特に水性担体中に溶解した本発明の複合体を含有することができる。担体は添加剤、例えば、可溶化剤、例えば、プロピレングリコール、界面活性剤、例えば、胆汁酸塩またはポリオキシエチレン高級アルコールエーテル、吸収増強剤、例えば、レシチン（ホスファチジルコリン）またはシクロデキストリン、または保存剤、例えば、パラビンを含有することができる。

【0059】

組成物は、また、局所的または全身的注射または注入に適当な形態であることができ、そして、そのまま、無菌の水または等張生理食塩水またはグルコース溶液を使用して処方することができる。組成物は、この分野においてよく知られている慣用の滅菌技術により滅菌することができる。生ずる水溶液は使用するために包装するか、あるいは無菌的条件下に濾過し、凍結乾燥することができ、凍結乾燥した調製物を投与前に無菌の水溶液と組合わせる。組成物は、生理学的状態に近似させるために薬学上許容される補助物質、例えば、緩衝化剤、張度調節剤およびその他、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、およびその他を含有することができる。

【0060】

本発明は、また、療法において使用する上に定義した薬理学的に活性なペプチド複合体、および療法において、例えば、中枢神経系の障害の治療において、ワクチン療法において、そしてHIV、癌、糖尿病、失禁、高血圧症、記憶消失、アルツハイマー病、熱、鬱病、性ホルモン調節、摂食、精神分裂病、骨粗しょう症および不眠の治療において、そして鎮痛薬および避妊薬として、および薬理学的に活性なペプチドの投与を含む療法により治療されることが知られているこのような適用において使用する医薬組成物を製造するための上に定義した薬理学的に活性なペプチド複合体の使用に関する。

【0061】

特定の態様において、ニューロンによる疼痛衝撃の伝達を抑制するためにエンケファリンと、Zを含んでなる複合体を使用することができ、成長ホルモンの放

出を刺激するために成長ホルモン放出ホルモンまたは成長ホルモン放出ペプチドと、Zを含んでなる複合体を使用することができ、ヘモグロビンのレベルを増加するためにBMP-1と、Zを含んでなる複合体を使用することができ、骨の喪失を予防または治療するために副甲状腺ホルモンと、Zを含んでなる複合体を使用することができ、糖尿病の治療においてグルコガン様ペプチド-1と、Zを含んでなる複合体を使用することができ、睡眠障害の治療においてデルタ睡眠誘発ペプチドと、Zを含んでなる複合体を使用することができ、そして性ホルモン産生を調節するためにゴナドトロピン放出ホルモンと、Zを含んでなる複合体を使用することができる。

【0062】

前述したように、臨床的に有用な薬剤としてペプチドを適用することに対する主要な障害は、大部分のペプチドが大部分の投与経路においてタンパク質分解により急速に代謝されるので、劣った送出し特性を有することである。結局、本発明の非常に重要な期待は、プロテアーゼによる分解に対して安定化され、同時に、遊離ペプチド(X)が薬学的作用を発揮する環境において薬学的作用を発揮することができる、哺乳動物、例えば、ヒトの治療のための薬理学的に活性なペプチド複合体の製造を可能とすることである。したがって、本発明は、また、症状または障害の治療または予防のためのペプチド複合体を製造するために、上に定義した薬理学的に活性なペプチド複合体を使用することに関し、ここでペプチド配列Xは、Zに結合しないとき、問題の症状または障害に関係するレセプター(またはレセプター系)と相互作用することができ、そしてZに結合しないとき、Xとレセプター(またはレセプター系)との間の相互作用は症状または障害に対して治療的または予防的作用を有する。

【0063】

こうして、本発明のペプチド複合体は、例えば、遊離ペプチドXが静脈内に投与される療法において、対応する遊離ペプチド(X)の代わりに使用することができると理解すべきである。なぜなら、本発明のペプチド複合体は体の中で支配的なタンパク質分解的バリアーを克服することができ、これにより前記ペプチド複合体はより好都合な方法において、例えば、経口的に添加することができるから

である。同様な方法において、本発明のペプチド複合体は、Xが体中で容易に分解されるか、あるいは体から容易に分泌されるので、対応する遊離ペプチド(X)を従来使用できなかった療法において、使用することができる。

【0064】

複合体の製造

本発明のペプチド複合体はそれ自体知られている方法により製造することができる。したがって、ペプチド配列XおよびZは、標準的ペプチド製造技術、例えば、溶液合成またはメリフィールド型固相合成により製造することができる。

1つの可能な合成法において、本発明のペプチド複合体は、固相合成により、まずよく知られている標準的保護、カップリングおよび脱保護の手法に従いペプチド配列Zを構築し、その後、Zの構築に類似する方法において順次に薬理的に活性な配列XをZ上にカップリングさせ、最後に全体のペプチド複合体を担体から切断することによって、製造することができる。この方法によれば、安定化ペプチド配列Zが薬理的に活性なペプチドXにXのC末端のカルボニル官能基において共有結合した、ペプチド複合体が生ずる。しかしながら、所望のペプチド複合体が、2つの安定化配列Zが薬理的に活性なペプチドXのC末端およびN末端に独立して共有結合している、ペプチド複合体である場合、前述の方法も適用できるが、当業者は理解するように、C末端の結合ペプチド複合体を固体支持体から切断する前に、前述の手法に類似する方法において、XのN末端に第2の安定化ペプチド配列Zを順次にカップリングさせることが必要である。また、この方法を使用して、ZをGluまたはAspの側鎖上のカルボニル官能基に結合させることができる。

【0065】

安定化ペプチド配列ZがN末端の窒素原子に共有結合しているか、あるいはXのLys、ArgまたはHisの側鎖上の窒素原子に共有結合している、ペプチド複合体を製造する可能な方法は前述の方法に類似する、すなわち、前記ペプチド複合体は、固相合成により、まずよく知られている標準的保護、カップリングおよび脱保護の手法に従い薬理的に活性なペプチド配列Xを構築し、その後、Xの構築に類似する方法において順次にX上に安定化ペプチド配列Zをカップリングさせ、最後に

全体のペプチド複合体を担体から切断することによって製造することができる。

【0066】

他の方法において、溶液合成、固相合成、組換え技術、または酵素的合成により、2つの配列XおよびZ（またはその部分）の一方または両方を別々に製造し、次いで溶液中でまたは固相技術によるか、あるいはそれらの組合わせにより、よく知られているセグメント縮合手法により2つの配列をカップリングさせる。1つの態様において、Xは組換えDNA法により製造し、そしてZは固相合成により製造することができる。XおよびZの複合は化学的結合により実施することができる。この技術により、高度に特異的な方法において完全に非保護のペプチドセグメントを組立てることができる(Liu 他、1996、J.Amer.Chem.Soc. 118:307-312およびDawson 他、1996、226:776)。また、複合はプロテアーゼを触媒とするペプチド結合の形成により実施することができ、これはペプチド結合を介して完全に非保護のペプチドセグメントを組合わせる高度に特異的な技術を提供する(W.Kullman、1987、Enzymatic Peptide Synthesis、CRC Press、フロリダ州ボカレイトン)。

【0067】

安定化ペプチド配列Zを使用するLys、Arg、His、Trp、Ser、Thr、Cys、Tyr、AspおよびGluの側鎖の誘導体化は、この分野において知られているように適当な直交保護スキームにより伝統的な集中的なペプチド合成により実施するか、あるいは適当な直交除去可能な側鎖保護を使用する等しくよく知られた一般的固相法により実施することができる。

【0068】

さらに、前述の方法の組合わせは特に適当であることが考えられ、ここで修飾ペプチド配列、例えば、等電子の結合、例えば、還元されたペプチド結合またはN-アルキル化ペプチド結合を含む薬理学的に活性なペプチドからの修飾ペプチド配列をペプチド配列Zにカップリングさせる。この場合において、アミノ酸を連続的にカップリングさせ、次いで完全な薬理学的に活性なペプチド配列X(溶液中でまたは固相技術を完全にまたは部分的に使用するか、あるいは組換え技術により製造された)をフラグメントにカップリングさせることによって、Zの固定化さ

れたフラグメントを製造することが好都合であることがある。

【0069】

適当な固体支持体物質(SSM)の例は、例えば、機能性樹脂、例えば、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、ポリエチレングリコール、セルロース、ポリエチレン、ポリスチレン上にグラフト化したポリエチレングリコール、ラテックス、ダイナビーズ、およびその他である。

ペプチド配列ZのC末端アミノ酸または薬理的に活性なペプチドXのC末端アミノ酸を、普通のリンカー、例えば、2,4-ジメトキシ-4'-ヒドロキシ-ベンゾフェノン、4-(4-ヒドロキシ-メチル-3-メトキシフェノキシ)-酪酸、4-ヒドロキシメチル安息香酸、4-ヒドロキシメチル-フェノキシ酢酸、3-(4-ヒドロキシメチルフェノキシ)プロピオン酸、およびp-[(R,S)-α[1-(9H-フルオレン-9-イル)メトキシホルムアミド]-2,4-ジメトキシベンジル]-フェノキシ-アミノ酸により、固体支持体物質に結合させることが必要であるか、あるいは望ましいことがあることを理解すべきである。

【0070】

本発明のペプチド複合体を固体支持体の物質から切断することができる。これは、必要に応じてこの目的に適当な1またはそれ以上の「スカベンジャー」、例えば、エタンジチオール、トリイソプロピルシラン、フェノール、チオアニソール、およびその他と組み合わせて、トリフルオロ酢酸、トリフルオロメタンスルホン酸、臭化水素酸、塩化水素、フッ化水素、およびその他のような酸を使用して実施することができる。あるいは、本発明のペプチド複合体は、塩基、例えば、アンモニア、ヒドラジン、アルコキシド、例えば、ナトリウムエトキシド、ヒドロキシド、例えば、水酸化ナトリウム、およびその他により、固体支持体から切断することができる。

【0071】

こうして、本発明は、また、下記の工程を含んでなる、ZがX(X-Z)にXのC末端官能性に共有結合した、薬理的に活性なペプチド複合体を製造する方法に関する：

- a) カルボキシル活性化形態のN-α-保護アミノ酸、またはC末端活性化形態

の $N\text{-}\alpha$ -保護ジペプチドを固定化ペプチド配列 $H\text{-}Z\text{-}SSM$ にカップリングし、これにより固定化 $N\text{-}\alpha$ -保護ペプチドフラグメントを形成し、

b) $N\text{-}\alpha$ -保護基を除去し、これにより非保護 N 末端を有する固定化ペプチドフラグメントを形成し、

c) 追加のカルボキシル活性化形態の $N\text{-}\alpha$ -保護アミノ酸、または追加の C 末端活性化形態の $N\text{-}\alpha$ -保護ジペプチドを固定化ペプチドフラグメントの N 末端にカップリングさせ、そして所望ペプチド配列 X が得られるまで、工程b)およびc)における除去／カップリング工程の手順を反復し、次いで

d) 固体支持体物質からペプチド複合体を切断する。

【0072】

それ以上の面において、本発明は、また、下記の工程を含んでなる、 Z が $X(Z\text{-}X)$ の N 末端窒素原子に共有結合した、薬理学的に活性なペプチド複合体を製造する方法に関する：

a) $N\text{-}\alpha$ -保護アミノ酸または $N\text{-}\alpha$ -保護ジペプチドを固体支持体物質(SSM)にカップリングさせ、これにより固定化 $N\text{-}\alpha$ -保護アミノ酸または固定化 $N\text{-}\alpha$ -保護ジペプチドフラグメントを形成し、

b) $N\text{-}\alpha$ -保護基を除去し、これにより非保護 N 末端を有する固定化アミノ酸またはペプチドフラグメントを形成し、

c) 追加のカルボキシル活性化形態の $N\text{-}\alpha$ -保護アミノ酸、または追加の C 末端活性化形態の $N\text{-}\alpha$ -保護ジペプチドを固定化アミノ酸またはペプチドフラグメントの N 末端にカップリングさせ、そして所望ペプチド配列 X が得られるまで、工程b)およびc)における除去／カップリング工程の手順を反復し、

d) 追加のカルボキシル活性化形態の $N\text{-}\alpha$ -保護アミノ酸、または追加の C 末端活性化形態の $N\text{-}\alpha$ -保護ジペプチドを固定化ペプチドフラグメントの N 末端にカップリングさせ、そして所望ペプチド配列 Z が得られるまで、工程b)およびd)における除去／カップリング工程の手順を反復し、次いで

e) 固体支持体物質からペプチド複合体を切断する。

【0073】

なおそれ以上の面において、本発明は、下記の工程を含んでなる、第1配列(Z)

をXのC末端官能性においてXに共有結合しかつ第2配列(Z)がX(Z-X-Z)のN末端窒素原子に共有結合した、薬理学的に活性なペプチド複合体を製造する方法に関する：

- a) カルボキシル活性化形態のN- α -保護アミノ酸、またはC末端活性化形態のN- α -保護ジペプチドを固定化ペプチド配列H-Z-SSM_iにカップリングし、これにより固定化N- α -保護ペプチドフラグメントを形成し、
- b) N- α -保護基を除去し、これにより非保護N末端を有する固定化ペプチドフラグメントを形成し、
- c) 追加のカルボキシル活性化形態のN- α -保護アミノ酸、または追加のC末端活性化形態のN- α -保護ジペプチドを固定化ペプチドフラグメントのN末端にカップリングさせ、そして所望ペプチド配列Xが得られるまで、工程b)およびc)における除去／カップリング工程の手順を反復し、次いで
- d) 追加のカルボキシル活性化形態のN- α -保護アミノ酸、または追加のC末端活性化形態のN- α -保護ジペプチドを固定化ペプチドフラグメントのN末端にカップリングさせ、そして所望ペプチド配列Zが得られるまで、工程b)およびd)における除去／カップリング工程の手順を反復し、次いで
- e) 固体支持体物質からペプチド複合体を切断する。

【0074】

保護の方法および選択した固相物質を考慮して、この分野において知られている方法により、カップリング、除去および切断の工程を実施する。しかしながら、一般に、Boc(t-ブチルオキシカルボニル)ならびにFmoc(9-フルオレニルメチルオキシカルボニル)保護方法は適用可能であり、そしてこの分野において知られている種々の活性化手順を使用して、例えば、適当なアミノ酸またはペプチドのC末端活性化誘導体(酸ハロゲン化物、酸無水物、活性化エステル、例えば、HObt-エステル、およびその他)をペプチド化学の分野において知られている関係するアミノ酸またはペプチドのアミノ基と反応させることによって、ペプチド結合を形成することができると考えられる。

【0075】

さらに、支配的条件下に反応性である官能基を担持するアミノ酸残基を使用す

るとき、側鎖の保護基を含めることが必要または望ましいことがある。必要な保護スキームはこの分野において知られている(例えば、下記の文献を参照のこと: M. BodanszkyおよびA. Bodanszky, "The Practice of Peptide Synthesis"、第2版、Springer-Verlag、1994、J. Jones, "The Chemical Synthesis of Peptides"、Clarendon Press、1991、およびDryland 他、1986、J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 1:125-137)。

【0076】

ペプチド複合体は、また、この分野において知られている一般的方法および原理を使用して組換えDNA技術により製造することができる。複合体をコードする核酸配列は、確立された標準的方法、例えば、S. L. BeaucageおよびM. H. Caruthers、Tetrahedron Letters 22:1981、pp.1859-1869に記載されているホスホルアミダイト法、またはMatthes 他、EMBO Journal 3:1984、pp.801-805に記載されている方法により、合成的に製造することができる。ホスホルアミダイト法によれば、オリゴヌクレオチドを、例えば、自動化DNA合成装置において合成し、精製し、アニーリングし、結合し、適当なベクター中でクローニングする。

【0077】

薬理的に活性なペプチドXをコードする核酸配列を単離またはクローニングするために使用する技術はこの分野において知られており、そしてゲノムDNAからの単離、cDNAからの製造、またはそれらの組合わせを包含する。このようなゲノムDNAからの本発明の核酸配列のクローニングは、例えば、よく知られているポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によるか、あるいは共有された構造的特徴をもつクローニングされたDNAを検出する発現ライブラリーの抗体スクリーニングにより、実施することができる。例えば、下記の文献を参照のこと: Innis 他、1990、A Guide to Methods and Application、Academic Press、New York。他の核酸増幅手法、例えば、リガーゼ連鎖反応(LCR)、結合した活性化転写(LAT)および核酸配列をベースとする増幅(NASBA)を使用することができる。次いで、Zをコードする核酸配列にそれを結合することができる。

【0078】

次いで、複合体をコードする核酸配列を組換え発現ベクターの中に挿入する。

発現ベクターは好都合に組換えDNA手法に付すことができる。ベクターの選択は、それを導入すべき宿主細胞にしばしば依存する。こうして、ベクターは自律的に複製するベクター、すなわち、染色体外の実在物として存在するベクター、例えば、プラスミドであることができる。このベクターの複製は染色体の複製に対して独立している。あるいは、ベクターは、宿主細胞の中に導入したとき、宿主細胞のゲノムの中に組込まれ、それが組込まれた¹またはそれ以上の染色体と一緒に複製するベクターであることができる。

【0079】

ベクターにおいて、本発明の複合体をコードする核酸配列は適当なプロモーター配列に作用可能に結合されるべきである。プロモーターは、選択した宿主細胞中で転写活性を示しかつ宿主細胞に対して相同的または異種であるタンパク質をコードする遺伝子に由来することができる、任意の核酸配列であることができる。哺乳動物細胞において前記複合体をコードする核酸配列の転写を指令する適当なプロモーターの例は、SV40プロモーター(Subramani 他、Mol.Cell.Biol. 1:1981, pp.854-864)、MT-1(メタロチオネイン遺伝子)プロモーター(Palmiter 他、Science 222:1983, pp.809-814)またはアデノウイルス²主要な後期プロモーター、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター(Boshart 他、1981、Cell 41:521-530)およびウシ乳頭腫ウイルス(BVP)である。昆虫細胞において使用するために適当なプロモーターはポリヘドリンプロモーターである(Vasuvedan 他、FEBS Lett. 311:1992, pp.7-11)。

【0080】

特に細菌の宿主細胞において、複合体をコードする核酸配列の転写を指令するために適当なプロモーターの例は下記のものから得られるプロモーターである：大腸菌(*E.coli*)lacオペロン、ストレプトマイセス(*Streptomyces*)コエリカラー(*coelicolor*)アガラーゼ遺伝子(*dagA*)、バシラス・サブチリス(*Bacillus subtilis*)レバンスクララーゼ遺伝子(*sacB*)、バシラス・リヘニフォルミス(*Bacillus lichniformis*)アルファ-アミラーゼ遺伝子(*amyL*)、バシラス・ステアロサーモフィラス(*Bacillus stearothermophilus*)マルトゲンアミラーゼ遺伝子(*amyM*)、バシラス・アミロリクファシエンス(*Bacillus amyloliquefaciens*)アルファアミラー

ゼ遺伝子(amyQ)、バシラス・リヘニフォルミス(*Bacillus licheniformis*)ペニシリナーゼ遺伝子(penP)、バシラス・サブチリス(*Bacillus subtilis*)xylAおよびxylB遺伝子、および原核生物のベクターラクタマーゼ遺伝子(Villa-Kamaroff 他、1978、Proceedings of the National Academy of Science USA 75:3727-3731)、ならびにtacプロモーター(DeBoer 他、1983、Proceedings of the National Academy of Science USA 242:74-94;およびSambrook 他、1989、supra.)。さらなるプロモーターは「Useful proteins from recombinant bacteria」(Scientific American, 1980)242:74-94およびSambrook他(1989)(上記)に記載されている。

【0081】

糸状菌の宿主細胞において複合体をコードする核酸配列の転写を指令するために適当なプロモーターの例は下記のものコードする遺伝子から得られるプロモーターである：アスペルギルス・オリゼ(*Aspergillus oryzae*)TAKAアミラーゼ、リゾムコル・ミエヘイ(*Rhizomucor miehei*)アスパラギン酸プロテイナーゼ、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)中性アルファアミラーゼ、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)酸安定性アルファアミラーゼ、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)またはアスペルギルス・アワモリ(*Aspergillus awamori*)グルコアミラーゼ(glaA)、リゾムコル・ミエヘイ(*Rhizomucor miehei*)リパーゼ、アスペルギルス・オリゼ(*Aspergillus oryzae*)アルカリ性プロテアーゼ、アスペルギルス・オリゼ(*Aspergillus oryzae*)トリオースホスフェートイソメラーゼ、アスペルギルス・ニズランズ(*Aspergillus nidulans*)アセトアミダーゼ、フザリウム・オキシスポラム(*Fusarium oxysporum*)トリプシン様プロテアーゼ(米国特許第4,288,627号、これは引用することによって本明細書の一部とされる)、およびそれらのハイブリッド。糸状菌の宿主細胞において使用するために特に好ましいプロモーターは、TAKAアミラーゼ、NA2-tpi(アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)中性アミラーゼおよびアスペルギルス・オリゼ(*Aspergillus oryzae*)トリオースホスフェートイソメラーゼをコードする遺伝子からのプロモーターのハイブリッド)、およびglaAプロモーターである。

【0082】

酵母の宿主細胞において、有用なプロモーターは、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)エノラーゼ(*ENO-1*)遺伝子、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)ガラクトキナーゼ遺伝子(*GAL1*)、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)アルコールデヒドロゲナーゼ/グルセロアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ遺伝子(*ADH2/GAP*)、およびサッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)3-ホスホグリセレートキナーゼ遺伝子から得られる。酵母の宿主細胞について他の有用なプロモーターは、Romanos 他、1992、*Yeasts* 8:423-488に記載されている。

【0083】

前記複合体をコードする核酸配列は、また、適当なターミネーター、例えば、ヒト成長ホルモントーミネーターに作用可能に結合することができる(Palmiter 他、op.cit.)。好ましい糸状菌の宿主細胞は、アスペルギルス・オリゼ(*Aspergillus oryzae*)TAKAアミラーゼ、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)グルコアミラーゼ、アスペルギルス・ニズランズ(*Aspergillus nidulans*)アントラニレートシンターゼ、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)アルファ-グルコシダーゼ、およびフザリウム・オキシスポラム(*Fusarium oxysporum*)トリブシン様プロテアーゼをコードする遺伝子から得られる。

【0084】

酵母の宿主細胞のために好ましいターミネーターは、サッカロミセス・セレビシエ(*S.cerevisiae*)エノラーゼ、サッカロミセス・セレビシエ(*S.cerevisiae*)シトクロムC(*cyc1*)、またはサッカロミセス・セレビシエ(*S.cerevisiae*)グルセロアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子から得られる。酵母の宿主細胞のための他の有用なターミネーターはRomanos 他、1992 (上記)に記載されている。

【0085】

ベクターは、ポリアデニル化シグナル(例えば、SV40またはアデノウイルス5E1 b領域から)、転写エンハンサー配列(例えば、SV40エンハンサー)および翻訳エンハンサー配列(例えば、アデノウイルスVA RNAをコードする配列)のような因子をさらに含むことができる。さらに、糸状菌の宿主細胞のために好ましいポリアデ

ニル化配列は、アスペルギルス・オリゼ(*Aspergillus oryzae*)TAKAアミラーゼ、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)グルコアミラーゼ、アスペルギルス・ニズランズ(*Aspergillus nidulans*)アントラニレートシンターゼおよびアスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)アルファグルコシダーゼをコードする遺伝子から得られる。酵母の宿主細胞のために有用なポリアデニル化配列は、GuoおよびSherman、1995、Molecular Cellular Biology 15:5983-5990に記載されている。

【0086】

組換え発現ベクターは、問題の宿主細胞中でベクターが複製できるようにするDNA配列をさらに含むことができる。このような配列の例(宿主細胞が哺乳動物細胞であるとき)はSV40またはポリオーマの複製起点である。細菌の複製起点の例は、プラスミドpBR322、pUC19、pACYC177、pACYC184、pUB110、pE194、pTA1060、およびpAM β 1の複製起点である。酵母の宿主細胞において使用する複製起点の例は、複製の2ミクロンの複製起点、CEN6とARS4との組み合わせ、およびCEN3とARS1との組み合わせである。複製起点は、宿主細胞中でそれを機能的温度感受性にする突然変異を有するものであることができる(例えば、下記の文献を参照のこと：Ehrlich、1978、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75:1433)。

【0087】

ベクターは、また、選択可能なマーカー、例えば、その産物が宿主細胞中の欠陥を補足する遺伝子、例えば、ジヒドロフォレートレダクターゼ(DHFR)または薬剤、例えば、ネオマイシン、ゲネチシン、アンピシリン、またはヒグロマイシンに対する耐性を与える遺伝子を含むことができる。酵母の宿主細胞に適切な適切なマーカーは、ADE2、HIS3、LEU2、LYS2、MET3、TRP1、およびURA3である。糸状菌の宿主細胞において使用するための選択可能なマーカーは、下記のものを包含するが、これらに限定されないものから成る群より選択することができる：amdS(アセトアミダーゼ)、argB(オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ)、bar(ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ)、hygB(ヒグロマイシンホスホトランスフェラーゼ)、niaD(ナイトレートレダクターゼ)、pyrG(オロチジン-5'-ホスフェートデカルボキシラーゼ)、SC(サルフェートアデニルトランスフェラー

ゼ)、trpC(アントラニレートシンターゼ)、およびグルフォシネート耐性マーカー、ならびに他の種の同等物。アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) またはアスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) の amdS および pyrG および サッカロマイセス・ヒグロスコピクス (*Saccharomyces hygroscopicus*) の bar マーカーは、アスペルギルス (*Aspergillus*) 細胞において使用するために好ましい。さらに、選択は、例えば、W091/17243号に記載されているように、共形質転換により達成することができ、ここで選択可能なマーカーは別々のベクター上に存在する。

【0088】

複合体をコードする核酸配列、プロモーターおよびターミネーターをそれぞれ、結合し、そして複製に必要な情報を含有する適当なベクターの中にそれらを挿入するために使用する手法は、当業者によく知られている(例えば、Sambrook 他、op.cit.)。

発現ベクターをその中に導入する宿主細胞は複合体を産生することができる任意の細胞であることができ、そして真核細胞、例えば、無脊椎動物(昆虫)の細胞または脊椎動物の細胞、例えば、キセノプス・レビス (*Xenopus laevis*) 卵母細胞または哺乳動物細胞、特に昆虫細胞および哺乳動物細胞であることができる。適当な哺乳動物細胞系の例は、COS(例えば、ATCC CRL 1650)、BHK(例えば、ATCC CRL 1632、ATCC CCL 10)またはCHO(例えば、ATCC CCL 61)細胞系統である。

【0089】

哺乳動物細胞をトランスフェクトしそして細胞の中に導入されたDNA配列を発現させる方法は、例えば、下記の文献に記載されている：KaufmanおよびSharp、1982、J.Mol.Biol. 159:SouthernおよびBerg、1982、J.Mol.Appl.Genet. 1:327-341;Loyter 他、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79:422-426;Wigler 他、Cell 14:725;CorsaroおよびPearson、1981、Somatic Cell Genetics 7:603;Grahamおよびvan der Eb、1973、Virology 52:456;Fraley 他、1980、JBC 225:10431;Capecchi、1980、Cell 22:479;Wiberg 他、1983、NAR 11:7287;およびNeumann 他、EMBO J. 1:841-845。

【0090】

また、宿主細胞は、単細胞病原体、例えば、原核生物、または非単細胞病原体、例えば、真核生物であることができる。有用な単細胞細胞は次のような細菌細胞である：例えば、次のものを包含するが、これらに限定されないグラム陽性細菌の細胞、バシラス (*Bacillus*) 細胞、例えば、バシラス・アルカロフィルス (*Bacillus alkalophilus*)、バシラス・アミロリクファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*)、バシラス・ブレビス (*Bacillus brevis*)、バシラス・サーキュランス (*Bacillus circulans*)、バシラス・コアギュランス (*Bacillus coagulans*)、バシラス・ラウツス (*Bacillus lautus*)、バシラス・レンツス (*Bacillus lentus*)、バシラス・リヘニフォルミス (*Bacillus licheniformis*)、バシラス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*)、バシラス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*)、バシラス・サブチリス (*Bacillus subtilis*)、およびバシラス・スリンジエンシス (*Bacillus thuringiensis*)；またはストレプトマイセス (*Streptomyces*) 細胞、例えば、ストレプトミセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*) またはストレプトマイセス・ムリヌス (*Streptomyces murinus*)；またはグラム陰性細菌、例えば、大腸菌 (*E. coli*) およびシュードモナス (*Pseudomonas*) 種。細菌の宿主細胞の形質転換は、例えば、プロトプラストの形質転換 (例えば、下記の文献を参照のこと：Chang および Cohen、1979、Molecular General Genetics 168:111-115) により、コンピテント細胞 (例えば、下記の文献を参照のこと：Young および Spizizin、1961、Journal of Bacteriology 81:823-829、または Dubnar および Davidoff Abelson、1971、Journal of Molecular Biology 56:209-211) を使用して、エレクトロポレーション (例えば、下記の文献を参照のこと：Shigekawa および Dower、1988、Biotechniques 6:742-751)、または複合 (例えば、下記の文献を参照のこと：Koehler および Thorne、1987、Journal of Molecular Biology 169:5771-5278) により実施することができる。

【0091】

宿主細胞は真菌細胞であることができる。「真菌」は、本明細書において使用するとき、下記のものを包含する：子囊菌門 (*Ascomycota*)、担子菌門 (*Basidiomycota*)、ツボカビ門 (*Chytridiomycota*)、および接合菌門 (*Zygomycota*) (下記において定義されている：Hawksworth 他、In, Aninsworth and Bisby's Dictionary

of The Fungi、第8版、1995、CAB International、University Press、Cambridge、UK)ならびに卵菌門(Oomycota)(Hawksworth 他、1995、supra、p.171に引用されている)およびすべての栄養胞子真菌(Hawksworth 他、1995、supra、)。子囊菌門(Ascomycota)の代表的なグループは下記のを包含する：例えば、ニューロスポラ(Neurospora)、エウペニシリウム(Eupenicillium)(=Penicillium)、エメリセラ(Emericella)(=Aspergillus)、エウロチウム(Eurotium)(=Aspergillus)、および上に列挙した真性酵母。真菌の宿主細胞は、また、酵母細胞であることができる。「酵母」は、本明細書において使用するとき、造囊酵母(Endomycetales)、造担子胞子酵母、および不完全菌(Balstomycetes)を包含する。細胞の培養に使用する培地は、哺乳動物細胞の成長に適当な任意の慣用培地、例えば、適当な補助成分を含有し、血清を含有するか、あるいは含有しない培地、あるいは昆虫細胞、酵母細胞または真菌細胞の成長に適当な培地であることができる。適当な培地は商業的供給会社から入手可能であるか、あるいは発表された処方に従い調製することができる(例えば、American Type Culture Collectionのカatalog)。

【0092】

次いで、細胞が産生する複合体を培地から慣用手法により回収することができる。このような慣用手法は、遠心または濾過により宿主細胞を培地から分離し、塩、例えば、硫酸アンモニウムにより上清または濾液からタンパク質成分を沈降させ、種々のクロマトグラフィー手法、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、またはその他により精製することを包含する。

【0093】

下記の実施例により、本発明をさらに例示する。

実施例

ペプチドの合成

一般的手法

装置および合成法

ポリプロピレンフィルターを装備した濾過用ポリエチレン容器中でN- α -アミ

ノ保護基として9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)および側鎖官能性に適当な普通の保護基を使用して、ペプチドをバッチ式で合成した(Dryland 他、1986、J.Chem.Soc.Perkin.Trans. 1:125-137)。

【0094】

溶媒

強カチオン交換樹脂(Lewatit S 100 MB/H強酸、Bayer AG Leverkusens、ドイツ国)を充填したカラムに溶媒DMF(N,N-ジメチルホルムアミド、Riedel de-Haen、ドイツ国)を通過させることによって精製し、そして、使用前に、遊離アミンが存在する場合、黄色を発生する3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1,2,3-ベンゾトリアジン(Dhbt-OH)の添加により、遊離アミンについて分析した。溶媒DM(ジクロロメタン、分析等級、Riedel de-Haen、ドイツ国)を精製せずに直接使用した。

【0095】

アミノ酸

Fmoc保護されたアミノ酸をMilliGen(英国)およびPerSeptive Biosystems GmbH(ドイツ国ハンブルグ)から適当な側鎖保護された形態で購入した。非タンパク質アミノ酸FmocOrn(Boc)-OH、Fmoc-2-D-Nal-OH、Fmoc-D-Phe-OH、Fmoc-Aib-OHをBachem(スイス国)から購入し、そしてFmocDbu(Boc)-OH、FmocDpr(Boc)-OHをNeosystem(フランス国)から購入した。

【0096】

リンカー

(4-ヒドロキシメチルフェノキシ)酢酸(HMPA)(Novabiochem、スイス国)を、樹脂に予備生成させたまたはin situ発生させた1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(Hob)エステルとしてDICによりカップリングさせた。

カップリング試薬

カップリング試薬(ジイソプロピルカーボジイミド)(DIC)を購入し(Riedel de-Haen、ドイツ国)、使用前に、蒸留し、そしてジシクロヘキシルカーボジイミド(DCC)を購入し(Merck-Schuchardt、ドイツ国ミュンヘン)、蒸留により精製した。

【0097】

固体支持体

下記型の固体支持体上で、DMF中の0.05Mまたはそれ高い濃度のFmoc保護活性化アミノ酸を使用して、Fmoc法に従い合成したペプチドを合成した。1) PEG-PS(ポリスチレン上にグラフトしたポリエチレングリコール；2) NovaSyn TG 樹脂、0.29mmol/g(Novabiochem、スイス国)；3) TentaGel S 樹脂、0.22~0.31mmol/g(TentaGel-S-NH₂；TentaGel S-Ram、TentaGel S PHB-Lys(Boc)Fmoc、TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc；Rapp polymere、ドイツ国)。

【0098】

触媒および他の試薬

ジイソプロピルエチルアミン(DIEA)を購入し(Aldrich、ドイツ国)、そしてエチレンジアミン(Fluka)、ピペリジンおよびピリジン(Riedel-de Haen、ドイツ国フランクフルト)を購入した。4-(N,N-ジメチルアミノ)ピリジン(DMAP)を購入し(Fluka、スイス国)、対称無水物を含むカップリング反応において触媒として使用した。エタンジチオールを購入した(Riedel-de Haen、ドイツ国フランクフルト)。3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1,2,3-ベンゾトリアジン(Dhbt-OH)および1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)を入手した(Fluka、スイス国)。

【0099】

酵素

ウシ膵臓からのカルボキシペプチダーゼA(EC 3.4.17.1)I型、ブタ腎臓からのロイシナミノペプチダーゼ(EC 3.4.11.1)型III-CP、ウシ膵臓からの α -キモトリプシン(EC 4.4.21.1)、およびブタ胃粘膜ウシ膵臓からのペプシンA(EC 3.4.23.1)を入手した(Sigma、英国)。

【0100】

カップリング手法

適当なN- α -保護アミノ酸から発生させたDMF中の対称無水物として、DICまたはDCCにより第1アミノ酸をカップリングさせた。適当なN- α -保護アミノ酸およびHOBTから製造した予備生成したHOBTエステルとして、DMF中のDICにより下記のアミノ酸をカップリングさせた。試験の間のFmoc脱保護を防止するために、80℃において実施したニンヒドリン試験により、アシル化を検査した(Larsen、B.D.

およびHolm, A., 1994, Int.J.Peptide Protein Res. 43:1-9)。

【0101】

HObt-エステルとしてのカップリング

方法a. 3当量のN- α -アミノ保護アミノ酸を3当量のHObtおよび3当量のDICと一緒にDMF中に溶解した。この溶液を室温において10分間放置し、次いで前活性化アミノ酸の添加前にDMF中の0.2% Dhbt-OH溶液で洗浄した樹脂に、添加した。

方法b. 3当量のN- α -アミノ保護アミノ酸を3当量のHObtと一緒にDMF中に溶解した。3当量のDICを使用直前に添加した。最終溶液を樹脂に添加した。

【0102】

予備生成した対称無水物

6当量のN- α -アミノ保護アミノ酸をDCM中に溶解し、0℃に冷却した。DCCまたはDIC(3当量)を添加し、反応を10分間続けた。溶媒を真空除去し、残留物をDMF中に溶解した。DCCを使用する場合、DMF溶液を濾過し、直ちに樹脂に添加し、次いで0.1当量のDMAPを添加した。

【0103】

第1 N- α -保護アミノ酸のカップリング収率の評価

3~5mgの乾燥Fmoc保護ペプチド樹脂をDMF中の5mlの20%ピペリジンで室温において10分間処理し、ジベンゾフルベン-ピペリジン付加物についてのUV吸収を301nmにおいて評価した。Fmoc-Ala-OH標準をベースとする計算した吸光係数 ϵ_{301} を使用して、収率を決定した。

【0104】

N- α -アミノFmoc保護基の脱保護

DMF中の20%ピペリジンで処理し(1×5および1×10分)、次いで排出したDMFにDhbt-OHを添加した後、黄色が検出できなくなるまで、DMFで洗浄することによって、Fmoc基の脱保護を実施した。

酸を使用する樹脂からのペプチドの切断

方法a. 95%トリフルオロ酢酸(TFA、Riedel-de Haen、ドイツ国フランクフルト)-水v/vまたは95%TFAおよび5%エタンジチオールv/vで室温において2時間処理することによって、ペプチドを樹脂から切断した。濾過した樹脂を95%TFA-水

で洗浄し、濾液および洗液を減圧下に蒸発させた。残留物をエーテルで洗浄し、酢酸-水から凍結乾燥させた。粗製の凍結乾燥した生成物を高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) により分析し、質量分析 (MS) により同定した。

【0105】

方法b. 95%トリフルオロ酢酸(TFA、Riedel-de Haen、ドイツ国フランクフルト)-水v/vまたは95%TFAおよび5%エタンジチオールv/vで室温において2時間処理することによって、ペプチドを樹脂から切断した。濾過した樹脂を95%TFA-水で洗浄し、濾液および洗液を10%酢酸の添加により希釈した。生ずる混合物をエーテルで3回洗浄し、最後に凍結乾燥させた。粗製の凍結乾燥した生成物を高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) により分析し、質量分析 (MS) により同定した。

【0106】

方法c. 95%トリフルオロ酢酸および5%トリイソプロピルシラン(Sigma)v/vで室温において2時間処理することによって、ペプチドを樹脂から切断した。濾過した樹脂を95%TFA-水で洗浄し、濾液および洗液を減圧下に蒸発させた。残留物をエーテルで洗浄し、酢酸-水から凍結乾燥させた。粗製の凍結乾燥した生成物を高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) により分析し、質量分析 (MS) により同定した。

【0107】

ジサルファイド結合の形成

粗製のAcm保護ペプチドをメタノール/水4:1中に溶解し、pHを3.33に調節し(濃酢酸の添加による)ペプチド濃度はほぼ 10^{-3} Mであった。メタノール中に溶解した10当量のヨウ素(20mg/ml)をペプチド溶液に一度に添加した。反応を-18~-20℃において4~5日間進行させ、次いでHPLCに付した。次いで反応混合物をさらに1体積の水の添加により希釈し、クロロホルムまたはテトラクロロメタンで3回抽出した。次いで、前述したように、透明な水溶液を凍結乾燥し、生成物を調製用HPLCにより精製した。

【0108】

PEG-PS上のバッチ式ペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に、

NovaSyn TG 樹脂(250mg、0.27~0.29mmol/g)を入れた。樹脂をDMF(5ml)中で膨潤させ、DMF中の20%ピペリジンで処理して、樹脂上の非プロトン化アミノ基の存在を保証した。樹脂を排液し、排出したDMFにDhbt-OHを添加した後、黄色が検出できなくなるまで、DMFで洗浄した。前述したように、HMPA(3当量)を予備生成HObt-エステルとしてカップリングさせ、カップリングを24時間続けた。樹脂を排液し、DMF(5×5ml、各々5分)で洗浄し、ニンヒドリン試験によりアシル化を検査した。前述したように、第1アミノ酸を予備生成対称無水物としてカップリングさせた。前述したように、第1Fmoc保護アミノ酸のカップリング収率を評価した。それはすべての場合において60%よりすぐれた。前述したように、配列に従い下記のアミノ酸を予備生成Fmoc保護された、必要に応じて、側鎖保護された、HObt-エステル(3当量)としてカップリングさせた。特記しない限り、カップリングを3時間続けた。樹脂を排液し、DMF(5×5ml、各々5分)で洗浄して、過剰の試薬を除去した。80℃において実施したニンヒドリン試験によりアシル化を検査した。合成が完結した後、ペプチド樹脂をDMF(5×5ml、各々5分)、DCM(3×5ml、各々1分)で洗浄し、最後にジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、一夜真空乾燥した。

【0109】

TentaGel S-NH₂上のバッチ式ペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に、TentaGel S-NH₂樹脂(100~500mg、0.22~0.31mmol/g)を入れた。樹脂をDMF(5~10ml)中で膨潤させ、DMF中の20%ピペリジンで処理して、樹脂上の非プロトン化アミノ基の存在を保証した。樹脂を排液し、排出したDMFにDhbt-OHを添加した後、黄色が検出できなくなるまで、DMFで洗浄した。前述したように、DICによりin situ発生させたHObt-エステルとしてHMPA(3当量)をカップリングさせ、カップリングを24時間続けた。樹脂を排液し、DMF(4×5~10ml、各々2分)で洗浄し、ニンヒドリン試験によりアシル化を検査した。前述したように、第1アミノ酸を予備生成対称無水物としてカップリングさせた。前述したように、第1Fmoc保護アミノ酸のカップリング収率を評価した。それはすべての場合において60%よりすぐれた。前述したように、配列に従い下記のアミノ酸をDICによりin situ発生さ

せたFmoc保護HObt-エステル(3当量)としてカップリングさせた。特記しない限り、カップリングを3時間続けた。樹脂を排液し、DMF(4×5~10ml、各々2分)で洗浄して、過剰の試薬を除去した。80℃において実施したニンヒドリン試験によりアシル化を検査した。合成が完結した後、ペプチド-樹脂をDMF(3×5~10ml、各々5分)、DCM(3×5~10ml、各々1分)で洗浄し、最後にジエチルエーテル(3×5~10ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0110】

TentaGel S-RAM上のバッチ式ペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に、TentaGel S-RAM樹脂(100~1000mg、0.22~0.31mmol/g)を入れた。樹脂をDMF(5~10ml)中で膨潤させ、前述した手順に従いFmoc基を除去した。前述したように、配列に従い下記のアミノ酸をDICによりin situ発生させたFmoc保護HObt-エステル(3当量)としてカップリングさせた。特記しない限り、カップリングを3時間続けた。樹脂を排液し、DMF(4×5~10ml、各々2分)で洗浄して、過剰の試薬を除去した。80℃において実施したニンヒドリン試験によりアシル化を検査した。合成が完結した後、ペプチド-樹脂をDMF(3×5~10ml、各々5分)、DCM(3×5~10ml、各々1分)で洗浄し、最後にジエチルエーテル(3×5~10ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0111】

HPLC条件

LC-6Aポンプ、215nmにおいて操作されるMERCK HITACHI L-4000 UV検出器および20 μ lのループをもつRheodyne 7125注入弁から成るシマズシステム上で、無勾配HPLC分析を実施した。無勾配分析に使用したカラムは、Spherisorb ODS-2(100×3mm;5 μ mの粒子)(Micorolab、デンマーク国アース)であった。

【0112】

MERCK-HITACHI L-6200 Intelligentポンプ、215nmにおいて操作されるMERCK HITACHI L-4000 UV検出器および20 μ lのループをもつRheodyne 7125注入弁上で、あるいはWaters 996光ダイオード配列検出器を装備したWaters 600 E上で、勾配を使用するHPLC分析を実施した。使用したカラムは、Rescorce(商標) RPC 1ml(W

aters)またはLiChroCART 125-4、LiChrospher 100 RP-18($5\mu\text{m}$) (Merck)であった。

【0113】

緩衝液Aは水中の0.1容量%のTFAであり、そして緩衝液Bは9.9容量%の水および0.1容量%のTFAであった。ペプチド分析のために下記の勾配のいずれかを使用して、緩衝液をカラムに1.3~1.5ml/分の流速で通過させた：1) 0%~100%のB(30分)の直線の勾配または2) 0%のB(2分)0%~50%のB(23分)50%~100%のB(5分)の直線の勾配。

【0114】

調製用HPLCについて、Waters 996光ダイオード配列検出器を装備したWaters 600 E上で、精製を実施した。使用したカラムは、Waters Delta-Pak C-18 $15\mu\text{m}$ 、100Å、25×100mmであった。勾配「2」を9ml/分の流速で使用した。

質量分析

エレクトロスプレー (ESI) プロープ (ES-MS) を装備したFinnigan Mat LCQ器具およびTofSpec E、Fisons Instrument (MALDI-TOF) 上で、マトリックスとして β -シアノー-p-ヒドロキシ桂皮酸を使用して、質量スペクトルを得た。

【0115】

個々のペプチドのペプチド合成

1. NovaSyn TentaGel上のH-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Glu₆-OH(Leu-エンケファリン-Glu₆-OH)のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥NovaSyn TG 樹脂(0.29mmol/g、250mg)を入れ、ペプチドプロープGlu₆が仕上がるまで「PEG-PS上のバッチ式ペプチド合成」で説明したように処理した。Leu-エンケファリン配列を形成する下記のアミノ酸を、Fmoc保護された、必要に応じて側鎖保護された、DICにより発生させたDMF(5ml)中の予備生成Hobtエステル(3当量)としてカップリングさせた。最後の5回のカップリングの各々の前に、樹脂をDhbt-OH(25ml中の80mg)の溶液で洗浄して、カップリング反応が進行するときの黄色の消失を追跡した。黄色がもはや見られなくなったとき、DMF(5×5ml、各々5分)で樹脂を洗浄することによって、カップリングを中断した。次いで、前述し

たように80℃において実施したニンヒドリン試験により、アシル化を検査した。合成が完結した後、ペプチド樹脂をDMF(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0116】

方法aに従いペプチドを樹脂から切断した。粗製の凍結乾燥した生成物をHPLCにより分析し、純度は90%よりすぐれることが見出された。ペプチドの同一性はES-MSにより確証された。収率76%。

2. NovaSyn TentaGel上のH-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys₆-OH(Leu-エンケファリン-Lys₆-OH)のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥NovaSyn TG 樹脂(0.29mmol/g、250mg)を入れ、ペプチドブローブLys₆が仕上がるまで「PEG-PS上のバッチ式ペプチド合成」で説明したように処理した。Leu-エンケファリン配列を形成する下記のアミノ酸を、Fmoc保護された、DICにより発生させたDMF(5ml)中の予備生成Hobtエステル(3当量)としてカップリングさせた。最後の5回のカップリングの各々の前に、樹脂をDhbt-OH(25ml中の80mg)の溶液で洗浄して、カップリング反応が進行するときの黄色の消失を追跡した。黄色がもはや見られなくなったとき、DMF(5×5ml、各々5分)で樹脂を洗浄することによって、カップリングを中断した。次いで、前述したように80℃において実施したニンヒドリン試験により、アシル化を検査した。合成が完結した後、ペプチド樹脂をDMF(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0117】

方法aに従いペプチドを樹脂から切断した。粗製の凍結乾燥した生成物をHPLCにより分析し、純度は98%よりすぐれることが見出された。ペプチドの同一性はES-MSにより確証された。収率84%。

3. NovaSyn TentaGel上のH-Lys₆-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH(H-Lys₆-Leu-エンケファリン)のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥NovaSyn TG 樹脂(0.29mmol/g、250mg)を入れ、「PEG-PS上のバッチ式ペプチド

合成」で説明したように処理し、カップリング手法について説明したように、第1アミノ酸ロイシンをカップリングさせた。H-Lys₆-エンケファリン配列を形成する下記のアミノ酸を、Fmoc保護された、DICにより発生させたDMF(5ml)中の予備生成Hobtエステル(3当量)としてカップリングさせ、カップリングを少なくとも2時間続けた。次いで、前述したように80℃において実施したニンヒドリン試験により、アシル化を検査した。合成が完結した後、ペプチド樹脂をDMF(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0118】

前述したように、切断剤として95% TFAおよび5%水(v/v)を使用して、ペプチドを樹脂から切断し、酢酸から凍結乾燥した。粗製の凍結乾燥した生成物をHPLCにより分析し、欠失を含まず均質であり、Fmoc保護された配列であることが見出された。純度は98%よりすぐれることが見出され、そしてペプチド複合体の同一性はES-MSにより確証された。収率89%。

4. NovaSyn TentaGel上のH-Lys₆-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH(H-Lys₆-Leu-エンケファリン-Lys₆-OH)のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥NovaSyn TG 樹脂(0.29mmol/g、250mg)を入れ、ペプチドブローブLys₆が仕上がるまで「PEG-PS上のバッチ式ペプチド合成」で説明したように処理した。H-Lys₆-エンケファリン配列を形成する下記のアミノ酸を、Fmoc保護された、DICにより発生させたDMF(5ml)中の予備生成Hobtエステル(3当量)としてカップリングさせ、カップリングを少なくとも2時間続けた。次いで、前述したように80℃において実施したニンヒドリン試験により、アシル化を検査した。合成が完結した後、ペプチド樹脂をDMF(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0119】

方法aに従いペプチドを樹脂から切断した。粗製の凍結乾燥した生成物をHPLCにより分析し、純度は98%よりすぐれることが見出された。ペプチドの同一性はES-MSにより確証された。収率90%。

5. TentaGel S-PHB-Lys(Boc)Fmoc上のH-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys-Lys-Glu-Glu-Glu-Lys-OH(Leu-エンケファリン-Lys-Lys-Glu-Glu-Glu-Lys-OH)のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥TentaGel S-PHB-Lys(Boc)Fmoc 樹脂(0.22mmol/g、500mg)を入れ、DMF(5ml)中で2時間膨潤させた。前述したように第1リシン上のFmoc基を除去し、ペプチド配列が仕上がるまで「TentaGel S-PHB-Lys(Boc)Fmoc上のバッチ式ペプチド合成」で説明したように、合成を続けた。合成が完結した後、ペプチド樹脂をDMF(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0120】

前述したように方法bに従いペプチドを樹脂から切断し、酢酸から凍結乾燥させた。前述の手順を使用してHPLCにより粗製の凍結乾燥した生成物を精製した。精製した生成物は均質であることが見出され、純度は90%よりすぐれることが見出された。ペプチドの同一性はES-MSにより確認された。収率60%。

6. TentaGel S-PHB-Lys(Boc)Fmoc上のH-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys-Glu-Glu-Glu-Lys-OH(Leu-エンケファリン-Lys-Glu-Glu-Glu-Lys-OH)のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥TentaGel S-PHB-Lys(Boc)Fmoc 樹脂(0.22mmol/g、500mg)を入れ、DMF(5ml)中で2時間膨潤させた。前述したように第1リシン上のFmoc基を除去し、ペプチド配列が仕上がるまで「TentaGel S-PHB-Lys(Boc)Fmoc上のバッチ式ペプチド合成」で説明したように、合成を続けた。合成が完結した後、ペプチド樹脂をDMF(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0121】

前述したように方法bに従いペプチドを樹脂から切断し、酢酸から凍結乾燥させた。前述の手順を使用してHPLCにより粗製の凍結乾燥したペプチドを精製した。精製した生成物は均質であることが見出され、純度は98%よりすぐれることが見出された。ペプチドの同一性はES-MSにより確認された。収率65%。

7. TentaGel S-NH₂上のH-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Orn)₆-OH(Leu-エンケファリン

-(Orn)₆-OH)のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥TentaGel S-NH₂ 樹脂(0.31mmol/g、500mg)を入れ、DMF(5ml)中で2時間膨潤させた。「TentaGel S 樹脂上のバッチ式ペプチド合成」で説明したように、配列に従いペプチドを組立てた。合成が完結した後、ペプチド-樹脂をDMF(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0122】

前述したように方法bに従いペプチドを樹脂から切断し、酢酸から凍結乾燥させた。粗製の凍結乾燥した生成物を前述の手順に従い酸化して、ジサルファイド結合を形成した。前述の手順を使用して調製用HPLCより粗製の環化したペプチドを精製した。精製した生成物は均質であることが見出され、純度は90%よりすぐれることが見出された。ペプチドの同一性はES-MSにより確認された。収率20%。

8. TentaGel S-NH₂ 上のH-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Dbu)₆-OH(Leu-エンケファリン-(Dbu)₆-OH)のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥TentaGel S-NH₂ 樹脂(0.31mmol/g、500mg)を入れ、DMF(5ml)中で2時間膨潤させた。「TentaGel S 樹脂上のバッチ式ペプチド合成」で説明したように、配列に従いペプチドを組立てた。合成が完結した後、ペプチド-樹脂をDMF(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0123】

前述したように方法bに従いペプチドを樹脂から切断し、酢酸から凍結乾燥させた。粗製の凍結乾燥したペプチドを前述の手順に従い酸化して、ジサルファイド結合を形成した。粗製の環化した生成物を前述の手段を使用して調製用HPLCより精製した。精製した生成物は均質であることが見出され、純度は90%よりすぐれることが見出された。ペプチドの同一性はES-MSにより確認された。収率22%。

9. TentaGel S-NH₂上のH-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Dpr)₆-OH(Leu-エンケファリン-(Dpr)₆-OH)のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥TentaGel S-NH₂ 樹脂(0.31mmol/g、500mg)を入れ、DMF(5ml)中で2時間膨潤させた。「TentaGel S 樹脂上のバッチ式ペプチド合成」で説明したように、配列に従いペプチドを組立てた。合成が完結した後、ペプチド樹脂をDMF(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0124】

前述したように方法bに従いペプチドを樹脂から切断し、酢酸から凍結乾燥させた。前述の手順を使用して調製用HPLCより粗製のペプチドを精製した。精製した生成物は均質であることが見出され、純度は98%よりすぐれることが見出された。ペプチドの同一性はES-MSにより確認された。収率22%。

10. TentaGel S-PHB-Lys(Boc)Fmoc上のH-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys₁₀-OH(Leu-エンケファリン-Lys₁₀-OH)のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥TentaGel S-PHB-Lys(Boc)Fmoc 樹脂(0.22mmol/g、500mg)を入れ、DMF(5ml)中で2時間膨潤させた。前述したように第1リシン上のFmoc基を除去し、「TentaGel S 樹脂上のバッチ式ペプチド合成」で説明したように、ペプチド配列が仕上がるまで合成を続けた。合成が完結した後、ペプチド樹脂をDMF(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0125】

前述したように方法bに従いペプチドを樹脂から切断し、酢酸から凍結乾燥させた。前述の手順を使用して調製用HPLCより粗製の凍結乾燥したペプチドを精製した。精製した生成物は均質であることが見出され、純度は98%よりすぐれることが見出された。ペプチドの同一性はES-MSにより確認された。収率7.1%。

11. NovaSyn TentaGel上のH-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu-Glu₆-OH(DSIP-Glu₆-OH)のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥NovaSyn TG 樹脂(0.29mmol/g、250mg)を入れ、ペプチドブロープGlu₆が仕上がるまで、「PEG-PS上のバッチ式ペプチド合成」で説明したように処理した。DICにより発生させたDMF(5ml)中の予備生成Fmoc保護されたHobtエステル(3当量)として、DSIP配列を形成する下記のアミノ酸をカップリングさせた。最後の9回のカップリングの各々の前に、樹脂をDhbt-OH(25ml中の80mg)の溶液で洗浄して、カップリング反応が進行するときの黄色の消失を追跡した。黄色がもはや見られなくなったとき、DMF(5×5ml、各々5分)で樹脂を洗浄することによって、カップリングを中断した。次いで、前述したように80℃において実施したニンヒドリン試験により、アシル化を検査した。合成が完結した後、ペプチド樹脂をDMF(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0126】

方法aに従いペプチドを樹脂から切断した。粗製の凍結乾燥した生成物をHPLCにより分析し、純度は98%よりすぐれることが見出された。ペプチドの同一性はES-MSにより確証された。収率80%。

12. NovaSyn TentaGel上のH-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu-(Lys-Glu)₃-OH(DSIP-(Lys-Glu)₃-OH)のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥NovaSyn TG 樹脂(0.29mmol/g、250mg)を入れ、ペプチドブロープ(Lys-Glu)₃が仕上がるまで、「PEG-PS上のバッチ式ペプチド合成」で説明したように処理した。DICにより発生させたDMF(5ml)中の予備生成Fmoc保護されたHobtエステル(3当量)として、DSIP配列を形成する下記のアミノ酸をカップリングさせた。最後の9回のカップリングの各々の前に、樹脂をDhbt-OH(25ml中の80mg)の溶液で洗浄して、カップリング反応が進行するときの黄色の消失を追跡した。黄色がもはや見られなくなったとき、DMF(5×5ml、各々5分)で樹脂を洗浄することによって、カップリングを中断した。次いで、前述したように80℃において実施したニンヒドリン試験により、アシル化を検査した。合成が完結した後、ペプチド樹脂をDMF(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1

分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0127】

方法aに従いペプチドを樹脂から切断した。粗製の凍結乾燥した生成物をHPLCにより分析し、純度は98%よりすぐれることが見出された。ペプチドの同一性はES-MSにより確認された。収率91%。

13. NovaSyn TentaGel上のH-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu-OH(DSIP)のペプチド合成 (参照)

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥NovaSyn TG 樹脂(0.29mmol/g、250mg)を入れ、「PEG-PS上のバッチ式ペプチド合成」で説明したように処理した。前述したように予備生成した対称無水物として、第1アミノ酸をカップリングさせた。第1 Fmoc保護アミノ酸のカップリング収率を前述したように評価した。収率はすべての場合において60%よりすぐれた。DICにより発生させたDMF(5ml)中の予備生成Fmoc保護されたHobtエステル(3当量)として、DSIP配列を形成する下記のアミノ酸をカップリングさせた。最後の8回のカップリングの各々の前に、樹脂をDhbt-OH(25ml中の80mg)の溶液で洗浄して、カップリング反応が進行するときの黄色の消失を追跡した。黄色がもはや見られなくなったとき、DMF(5×5ml、各々5分)で樹脂を洗浄することによって、カップリングを中断した。次いで、前述したように80℃において実施したニンヒドリン試験により、アシル化を検査した。合成が完結した後、ペプチド-樹脂をDMF(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0128】

方法aに従いペプチドを樹脂から切断した。粗製の凍結乾燥した生成物をHPLCにより分析し、純度は98%よりすぐれることが見出された。ペプチドの同一性はES-MSにより確認された。収率78%。

14. NovaSyn TentaGel上のH-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-Lys₆-OH(サブスタンス P-Lys₆-OH)のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥NovaSyn TG 樹脂(0.29mmol/g、250mg)を入れ、ペプチドブローブLys₆が仕上が

るまで、「PEG-PS上のバッチ式ペプチド合成」で説明されたように処理した。DI Cにより発生させたDMF(5ml)中の予備生成Fmoc保護されたHobtエステル(3当量)として、サブスタンスP配列を形成する下記のアミノ酸をカップリングさせ、カップリングを少なくとも2時間続けた。次いで、前述したように80℃において実施したニンヒドリン試験により、アシル化を検査した。合成が完結した後、ペプチド樹脂をDMF(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0129】

方法aに従いペプチドを樹脂から切断した。粗製の凍結乾燥した生成物をHPLCにより分析し、純度は98%よりすぐれることが見出された。ペプチドの同一性はES-MSにより確認された。収率80%。

15. TentaGel S-RAM上のH-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ (サブスタンスP-NH₂)のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥TentaGel S-RAM 樹脂(0.25mmol/g、500mg)を入れ、DMF(5ml)中で2時間膨潤させた。前述の手順に従いFmoc基を除去し、「TentaGel S-RAM 樹脂上のバッチ式ペプチド合成」で説明したように、配列に従うペプチドを組立てた。合成が完結した後、ペプチド樹脂をDMF(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0130】

前述したように方法bに従いペプチドを樹脂から切断し、酢酸から凍結乾燥させた。前述の手順を使用して調製用HPLCより粗製ペプチドを精製した。精製した生成物は均質であることが見出され、純度は98%よりすぐれることが見出された。ペプチドの同一性はES-MSにより確認された。収率12.3%。

16. TentaGel S-RAM-Lys(Boc)Fmoc上のH-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-Lys-NH₂ (サブスタンスP-Lys-NH₂)のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥TentaGel S-RAM-Lys(Boc)Fmoc 樹脂(0.22mmol/g、500mg)を入れ、DMF(5ml)中で2時間膨潤させた。前述したように第1リシン上のFmoc基を除去し、「TentaGel

S-RAM-Lys(Boc)Fmoc 樹脂上のバッチ式ペプチド合成」で説明したように、ペプチド配列が仕上がるまで合成を続けた。合成が完結した後、ペプチド樹脂をDMF(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0131】

前述したように方法bに従いペプチドを樹脂から切断し、酢酸から凍結乾燥させた。粗製の凍結乾燥した生成物を前述の手段を使用して調製用HPLCより精製した。精製した生成物は均質であることが見出され、純度は98%よりすぐれることが見出された。ペプチドの同一性はES-MSにより確認された。収率17.2%。

17. TentaGel S-RAM上のH-(Lys)₆-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ (K₆-サブスタンスP-NH₂)のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥TentaGel S-RAM 樹脂(0.25mmol/g、500mg)を入れ、DMF(5ml)中で2時間膨潤させた。前述した手順に従いFmoc基を除去し、「TentaGel S-RAM 樹脂上のバッチ式ペプチド合成」で説明したように、配列に従いペプチドを組立てた。合成が完結した後、ペプチド樹脂をDMF(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0132】

前述したように方法bに従いペプチドを樹脂から切断し、酢酸から凍結乾燥させた。粗製の凍結乾燥した生成物を前述の手順を使用して調製用HPLCより精製した。精製した生成物は均質であることが見出され、純度は98%よりすぐれることが見出された。ペプチドの同一性はES-MSにより確認された。収率10.3%。

18. TentaGel S-RAM-Lys(Boc)Fmoc上のH-Aib-His-2-D-Nal-D-Phe-Lys-(Lys)₆-NH₂ (GHRP-(Lys)₆-NH₂)のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥TentaGel S-RAM-Lys(Boc)Fmoc 樹脂(0.22mmol/g、500mg)を入れ、DMF(5ml)中で2時間膨潤させた。前述したように第1リシン上のFmoc基を除去し、「TentaGel S-RAM-Lys(Boc)Fmoc 樹脂上のバッチ式ペプチド合成」で説明したように、ペプチド配列が仕上がるまで合成を続けた。合成が完結した後、ペプチド樹脂をDMF

(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0133】

前述したように方法bに従いペプチドを樹脂から切断し、酢酸から凍結乾燥させた。粗製の凍結乾燥した生成物を前述の手順を使用して調製用HPLCより精製した。精製した生成物は均質であることが見出され、純度は90%よりすぐれることが見出された。ペプチドの同一性はES-MSにより確認された。収率35%。

19. TentaGel S-RAM上のH-Aib-His-2-D-Nal-D-Phe-Lys-NH₂ (GHRP-NH₂)のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥TentaGel S-RAM 樹脂(0.25mmol/g、500mg)を入れ、DMF(5ml)中で2時間膨潤させた。前述した手順に従いFmoc基を除去し、「TentaGel S-RAM 樹脂上のバッチ式ペプチド合成」で説明したように、配列に従いペプチドを組立てた。合成が完了した後、ペプチド-樹脂をDMF(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0134】

前述したように方法bに従いペプチドを樹脂から切断し、酢酸から凍結乾燥させた。粗製の凍結乾燥した生成物は均質であることが見出され、純度は95%よりすぐれることが見出された。ペプチドの同一性はES-MSにより確認された。収率21%。

20. TentaGel S-RAM上のH-(Lys)₆-Aib-His-2-D-Nal-D-Phe-Lys-NH₂ (K6-GHRP-NH₂)のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥TentaGel S-RAM 樹脂(0.25mmol/g、500mg)を入れ、DMF(5ml)中で2時間膨潤させた。前述した手順に従いFmoc基を除去し、「TentaGel S-RAM 樹脂上のバッチ式ペプチド合成」で説明したように、配列に従いペプチドを組立てた。合成が完了した後、ペプチド-樹脂をDMF(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0135】

前述したように方法bに従いペプチドを樹脂から切断し、酢酸から凍結乾燥させた。粗製の凍結乾燥した生成物は均質であることが見出され、純度は95%よりすぐれることが見出された。ペプチドの同一性はES-MSにより確認された。収率19%。

21. NovaSyn TentaGel上のGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-Lys₆-OH (GnRH-Lys₆-OH)のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥NovaSyn TG 樹脂(0.29mmol/g、250mg)を入れ、ペプチドブロープLys₆が仕上がるまで、「PEG-PS上のバッチ式ペプチド合成」で説明したように処理した。DICにより発生させたDMF(5ml)中の予備生成Fmoc保護されたHobtエステル(3当量)として、GnRH配列を形成する下記のアミノ酸をカップリングさせ、カップリングを少なくとも2時間続けた。次いで、前述したように80℃において実施したニンヒドリン試験により、アシル化を検査した。合成が完結した後、ペプチド-樹脂をDMF(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0136】

方法cに従いペプチドを樹脂から切断した。粗製の凍結乾燥した生成物をHPLCにより分析し、それはターゲットペプチドを多少の不純物と一緒に含有することが見出された。粗製生成物を調製用逆相HPLCにより精製した。純度は98%よりすぐれることが見出され、ペプチド複合体の同一性はES-MSにより確認された。収率37%。

22. NovaSyn TentaGel上のpGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-(Lys-Glu)₃-OH(GnRH-(Lys-Glu)₃-OH)のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥NovaSyn TG 樹脂(0.29mmol/g、250mg)を入れ、ペプチドブロープ(Lys-Glu)₃が仕上がるまで、「PEG-PS上のバッチ式ペプチド合成」で説明したように処理した。DICにより発生させたDMF(5ml)中の予備生成Fmoc保護されたHobtエステル(3当量)として、GnRH配列を形成する下記のアミノ酸をカップリングさせ、カップリングを少なくとも2時間続けた。次いで、前述したように80℃において実施した

ニンヒドリン試験により、アシル化を検査した。合成が完結した後、ペプチド樹脂をDMF(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0137】

方法cに従いペプチドを樹脂から切断した。粗製の凍結乾燥した生成物をHPLCにより分析し、それはターゲットペプチドを多少の不純物と一緒に含有することが見出された。粗製生成物を調製用逆相HPLCにより精製した。純度は98%よりすぐれることが見出され、ペプチド複合体の同一性はES-MSにより確証された。収率43%。

23. TentaGel S-RAM上のpGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (GnRH-NH₂)NH₂ のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥TentaGel S-RAM 樹脂(0.25mmol/g、500mg)を入れ、DMF(5ml)中で2時間膨潤させた。前述した手順に従いFmoc基を除去し、「TentaGel S-RAM 樹脂上のバッチ式ペプチド合成」で説明したように、配列に従いペプチドを組立てた。合成が完結した後、ペプチド樹脂をDMF(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0138】

前述したように方法bに従いペプチドを樹脂から切断し、酢酸から凍結乾燥させた。粗製の凍結乾燥した生成物は均質であることが見出され、純度は95%よりすぐれることが見出された。ペプチドの同一性はES-MSにより確証された。収率28%。

24. TentaGel S-RAM上のH-(Lys)₆-Gln-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (K₆-GnRH-NH₂)NH₂ のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥TentaGel S-RAM 樹脂(0.25mmol/g、500mg)を入れ、DMF(5ml)中で2時間膨潤させた。前述した手順に従いFmoc基を除去し、「TentaGel S-RAM 樹脂上のバッチ式ペプチド合成」で説明したように、配列に従いペプチドを組立てた。合成が完結した後、ペプチド樹脂をDMF(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジ

エチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

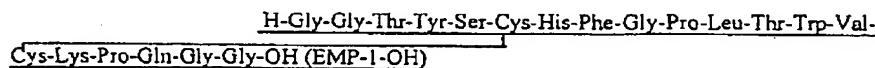
【0139】

前述したように方法bに従いペプチドを樹脂から切断し、酢酸から凍結乾燥させた。粗製の凍結乾燥した生成物は均質であることが見出され、純度は95%よりすぐれることが見出された。ペプチドの同一性はES-MSにより確認された。収率20%。

25. TentaGel S-NH₂ 上の

【0140】

【化3】



【0141】

のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥TentaGel S-NH₂ 樹脂(0.31mmol/g、500mg)を入れ、DMF(5ml)中で2時間膨潤させた。「TentaGel S 樹脂上のバッチ式ペプチド合成」で説明したように、配列に従いペプチドを組立てた。合成が完結した後、ペプチド-樹脂をDMF(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0142】

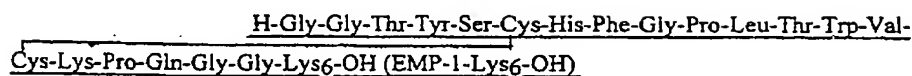
前述したように方法bに従いペプチドを樹脂から切断し、酢酸から凍結乾燥させた。前述の手順に従いジサルファイド結合を形成するために、粗製の凍結乾燥した生成物をそれ以上精製しないで酸化した。前述の手順を使用して調製用HPLCにより、粗製環化ペプチドを精製した。精製された生成物は均質であることが見出され、純度は98%よりすぐれることが見出された。ペプチドの同一性はES-MS

により確認された。収率22%。

26. TentaGel S-PHB-Lys(Boc)Fmoc上の

【0143】

【化4】



【0144】

のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥TentaGel S-PHB-Lys(Boc)Fmoc 樹脂(0.22mmol/g、500mg)を入れ、DMF(5ml)中で2時間膨潤させた。前述したように第1リシン上のFmoc基を除去し、「TentaGel S-PHB-Lys(Boc)Fmoc 樹脂上のバッチ式ペプチド合成」で説明したように、ペプチド配列が仕上がるまで合成を続けた。合成が完結した後、ペプチド樹脂をDMF(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

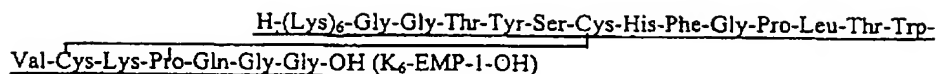
【0145】

前述したように方法bに従いペプチドを樹脂から切断し、酢酸から凍結乾燥させた。前述の手順に従いジサルファイド結合を形成するために、粗製の凍結乾燥した生成物をそれ以上精製しないで酸化した。粗製環化ペプチドを前述の手順を使用して調製用HPLCより精製した。精製した生成物は均質であることが見出され、純度は98%よりすぐれることが見出された。ペプチドの同一性はES-MSにより確認された。収率27%。

27. TentaGel S-NH₂上の

【0146】

【化5】



【0147】

のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥TentaGel S-NH₂ 樹脂(0.31mmol/g、500mg)を入れ、DMF(5ml)中で2時間膨潤させた。「TentaGel S 樹脂上のバッチ式ペプチド合成」で説明したように、配列に従いペプチドを組立てた。合成が完結した後、ペプチド樹脂をDMF(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0148】

前述したように方法bに従いペプチドを樹脂から切断し、酢酸から凍結乾燥させた。前述の手順に従いジサルファイド結合を形成するために、粗製の凍結乾燥した生成物をそれ以上精製しないで酸化した。前述の手順を使用して調製用HPLCにより、粗製環化ペプチドを精製した。精製された生成物は均質であることが見出され、純度は98%よりすぐれることが見出された。ペプチドの同一性はES-MSにより確認された。収率12%。

28. TentaGel S-NH₂ 上のH-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-OH(GLP-1-(7-36)(ヒト)-OH)のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥TentaGel S-NH₂ 樹脂(0.31mmol/g、500mg)を入れ、DMF(5ml)中で2時間膨潤させた。「TentaGel S 樹脂上のバッチ式ペプチド合成」で説明したように、配列に従いペプチドを組立てた。合成が完結した後、ペプチド樹脂をDMF(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0149】

前述したように方法bに従いペプチドを樹脂から切断し、酢酸から凍結乾燥させた。前述の手順を使用して調製用HPLCにより、粗製の凍結乾燥したペプチドを2回精製した。精製された生成物は均質であることが見出され、純度は98%よりすぐれることが見出された。ペプチドの同一性はES-MSにより確認された。収率8.7%。

29. TentaGel S-PHB-Lys(Boc)Fmoc 上の H-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Lys₆-OH(GLP-1-(7-36)(ヒト)-Lys₆-OH) のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥TentaGel S-PHB-Lys(Boc)Fmoc 樹脂(0.22mmol/g、500mg)を入れ、DMF(5ml)中で2時間膨潤させた。前述したように第1リシン上のFmoc基を除去し、「TentaGel S-PHB-Lys(Boc)Fmoc 樹脂上のバッチ式ペプチド合成」で説明したように、ペプチド配列が仕上がるまで合成を続けた。合成が完結した後、ペプチド-樹脂をDMF(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0150】

前述したように方法bに従いペプチドを樹脂から切断し、酢酸から凍結乾燥させた。前述の手順を使用して調製用HPLCにより、粗製の凍結乾燥したペプチドを2回精製した。精製された生成物は均質であることが見出され、純度は98%よりすぐれることが見出された。ペプチドの同一性はES-MSにより確認された。収率11%。

30. TentaGel S-NH₂ 上の H-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-OH(PTH(1-34)(ヒト)-OH) のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥TentaGel S-NH₂ 樹脂(0.31mmol/g、500mg)を入れ、DMF(5ml)中で2時間膨潤させた。「TentaGel S 樹脂上のバッチ式ペプチド合成」で説明したように、配列に従いペプチドを組立てた。合成が完結した後、ペプチド-樹脂をDMF(3×5ml、

各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0151】

前述したように方法bに従いペプチドを樹脂から切断し、酢酸から凍結乾燥させた。前述の手順を使用して調製用HPLCにより、粗製の凍結乾燥したペプチドを2回精製した。精製された生成物は均質であることが見出され、純度は98%よりすぐれることが見出された。ペプチドの同一性はES-MSにより確認された。収率6.1%。

31. TentaGel S-PHB-Lys(Boc)Fmoc上のH-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-Lys₆-OH(PTH(1-34))(ヒト)-Lys₆-OH)のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥TentaGel S-PHB-Lys(Boc)Fmoc 樹脂(0.22mmol/g、500mg)を入れ、DMF(5ml)中で2時間膨潤させた。前述したように第1リシン上のFmoc基を除去し、「TentaGel S-PHB-Lys(Boc)Fmoc 樹脂上のバッチ式ペプチド合成」で説明したように、ペプチド配列が仕上がるまで合成を続けた。合成が完結した後、ペプチド-樹脂をDMF(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0152】

前述したように方法bに従いペプチドを樹脂から切断し、酢酸から凍結乾燥させた。前述の手順を使用して調製用HPLCにより、粗製の凍結乾燥したペプチドを2回精製した。精製された生成物は均質であることが見出され、純度は98%よりすぐれることが見出された。ペプチドの同一性はES-MSにより確認された。収率5.3%。

32. NovaSyn TentaGel上のH-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-(Lys-Glu)₃-OH(PTH1-34ヒト)-(Lys-Glu)₃-OH)のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥NovaSyn TG 樹脂(0.29mmol/g、250mg)を入れ、ペプチドブローブ(Lys-Glu)₃が仕上がるまで、「PEG-PS上のバッチ式ペプチド合成」で説明したように処理した。DICにより発生させたDMF(5ml)中の予備生成Fmoc保護されたHobtエステル(3当量)として、PTH配列を形成する下記のアミノ酸をカップリングさせ、カップリングを少なくとも2時間続けた。次いで、前述したように80℃において実施したニンヒドリン試験により、アシル化を検査した。合成が完結した後、ペプチド樹脂をDMF(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0153】

方法Cに従いペプチドを樹脂から切断した。粗製の凍結乾燥した生成物をHPLCにより分析し、それはターゲットペプチドを多少の不純物と一緒に含有することが見出された。粗製生成物を調製用逆相HPLCにより精製した。純度は98%よりすぐれることが見出され、ペプチド複合体の同一性はES-MSにより確証された。収率28%。

33. TentaGel S-NH₂ 上のH-(Lys)₆-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-OH(Lys₆-PTH(1-34)(ヒト)-OH)のペプチド合成

濾過のためにポリプロピレンフィルターを装備したポリエチレン容器の中に乾燥TentaGel S-NH₂ 樹脂(0.31mmol/g、500mg)を入れ、DMF(5ml)中で2時間膨潤させた。「TentaGel S 樹脂上のバッチ式ペプチド合成」で説明したように、配列に従いペプチドを組立てた。合成が完結した後、ペプチド樹脂をDMF(3×5ml、各々1分)、DCM(3×5ml、各々1分)、ジエチルエーテル(3×5ml、各々1分)で洗浄し、真空乾燥した。

【0154】

前述したように方法bに従いペプチドを樹脂から切断し、酢酸から凍結乾燥させた。前述の手順を使用して調製用HPLCにより、粗製の凍結乾燥したペプチドを2回精製した。精製された生成物は均質であることが見出され、純度は90%よりすぐれることが見出された。ペプチドの同一性はES-MSにより確証された。収率6

.2%。

【0155】

in vitro反応速度論的測定

HPLC

ヒューレット・パッカート(Hewlett-Packard)HP 1100 HPLCシステムを使用して、後述するように実行したin vitro反応速度論的測定からの試料の勾配HPLC分析を実施した。このHPLCシステムは、HP 100バイナリーポンプ、HP 1100 オートサンプラー、HP 1100 カラムサーモスタットおよびHP 1100 可変波長検出器から成っていた。Lichrospher RP-18($5\mu\text{m}$ の粒子)を充填したメルク(Merck)LiChroCA RTカラム($125\times 4\text{mm}$ 内径)およびLiChroCARTプレカラム($4\times 4\text{mm}$ 内径)を使用した。カラムを $25^{\circ}\text{C}\sim 75^{\circ}\text{C}$ に保持し、そしてカラムの流出液を 215nm においてUV検出器で測定した。 $1\text{ml}/\text{分}$ の流速において移動相A(水中の0.1容量%のTFA)および移動相B(アセトニトリル中の0.085容量%のTFA)の混合物でカラムを勾配溶離することによって、分解生成物および反応溶液の構成成分からのペプチド複合体または自然ペプチドの分離を実施した。使用した直線の勾配を下記表1に示す：

【0156】

【表1】

HPLC 勾配	ペプチド/ペプチド複合体
25-40% B、 15 分	H-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-OH (PTH(1-34)(ヒト)-OH)
25-40% B、 15 分	H-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-(Lys) ₆ -OH (PTH(1-34)(ヒト)-(Lys) ₆ -OH)

【0157】

【表2】

HPLC 勾配	ペプチド/ペプチド複合体
25 - 40% B 、 15 分	H-(Lys) ₆ -Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His- Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp- Val-His-Asn-Phe-OH <i>((Lys)₆-PTH(1-34)(ヒト)-OH)</i>
25 - 50% B 、 15 分	H-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly- Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-OH <i>(GLP-1(7-36)(ヒト)-OH)</i>
25 - 50% B 、 15 分	H-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly- Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-(Lys) ₆ -OH <i>(GLP-1(7-36)(ヒト)-(Lys)₆-OH)</i>
5 - 50% B 、 15 分	H-Gly-Gly-Thr-Tyr-Ser-Cys-His-Phe-Gly-Pro-Leu-Thr-Trp-Val-Cys-Lys- Pro-Gln-Gly-Gly-OH <i>(EMP-1-OH)</i>
5 - 50% B 、 15 分	H-Gly-Gly-Thr-Tyr-Ser-Cys-His-Phe-Gly-Pro-Leu-Thr-Trp-Val-Cys-Lys- Pro-Gln-Gly-Gly-(Lys) ₆ -OH <i>(EMP-1-(Lys)₆-OH)</i>
10 - 50% B 、 15 分	H-(Lys) ₆ -Gly-Gly-Thr-Tyr-Ser-Cys-His-Phe-Gly-Pro-Leu-Thr-Trp-Val- Cys-Lys-Pro-Gln-Gly-Gly-OH <i>((Lys)₆-EMP-1-OH)</i>
10 - 50% B 、 15 分	H-(Lys) ₆ -Gly-Gly-Thr-Tyr-Ser-Cys-His-Phe-Gly-Pro-Leu-Thr-Trp-Val- Cys-Lys-Pro-Gln-Gly-Gly-(Lys) ₆ -OH <i>((Lys)₆-EMP-1-(Lys)₆-OH)</i>
5 - 40% B 、 15 分	H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂ <i>(サファタン P-NH₂)</i>
5 - 40% B 、 15 分	H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-(Lys) ₆ -NH ₂ <i>(サファタン P-(Lys)₆-NH₂)</i>

【0158】

【表3】

HPLC 勾配	ペプチド/ペプチド複合体
25-40% B 、 15 分	H-(Lys) ₆ -Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂ (Lys) ₆ -サブスタンス P-NH ₂)
40-100% B 、15 分	H-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu-OH (DSIP)
40-100% B 、15 分	H-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu-(Lys-Glu) ₃ -OH (DSIP-(Lys-Glu) ₃ -OH)
5-30% B 、 15 分	H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH (Leu-インケフアリノ)
5-30% B 、 15 分	H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Lys) ₆ -OH (Leu-インケフアリノ)-(Lys) ₆ -OH)
10-35% B 、 15 分	H-(Lys) ₆ -Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH (Lys) ₆ -Leu-インケフアリノ-OH)
10-35% B 、 15 分	H-(Lys) ₆ -Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Lys) ₆ -OH (Lys) ₆ -Leu-インケフアリノ-(Lys) ₆ -OH)
5-30% B 、 15 分	H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Lys) ₁₀ -OH (Leu-インケフアリノ)-(Lys) ₁₀ -OH)
5-30% B 、 15 分	H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Orn) ₆ -OH (Leu-インケフアリノ)-(Orn) ₆ -OH)
5-30% B 、 15 分	H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Dbu) ₆ -OH (Leu-インケフアリノ)-(Dbu) ₆ -OH)
5-30% B 、 15 分	H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Dpr) ₆ -OH (Leu-インケフアリノ)-(Dpr) ₆ -OH)
5-30% B 、 15 分	H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys(Glu) ₄ -Lys-OH (Leu-インケフアリノ)-Lys-(Glu) ₄ -Lys-OH)

【0159】

【表4】

HPLC 勾配	ペプチド/ペプチド複合体
5-30% B、 15 分	H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys-(Glu) ₃ -(Lys) ₂ -OH (Leu-1)カッパリノ-Lys-(Glu) ₃ -(Lys) ₂ -OH

【0160】

酵素溶液中の加水分解の反応速度論

ロイシンアミノペプチダーゼ(25単位/ml)またはカルボキシペプチダーゼA(1または25単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中で37℃において、ペプチド複合体および対応する自然ペプチドの分解を研究した。ペプチド複合体または自然ペプチドの貯蔵液(1mg/ml)のアリコート(100 μ l)を、900 μ lの予熱酵素溶液に約0.1mg/ml(10^{-5} ~ 10^{-4} M)のペプチド複合体または自然ペプチドの最終濃度となるように添加することによって、実験を開始した。SHT2000(Stuart Scientific)ブロックヒーターを使用して、ペプチド/酵素溶液を37℃に保持した。適当な時間間隔で、100 μ lの試料をペプチド/酵素溶液から拔出し、20 μ lのアセトニトリル中の25%TFAとよく混合して酵素分解プロセスを停止させ、前述したように、HPLCにより分析した。自然対数/残留ペプチド濃度(HPLCピーク高さ)の時間に対するプロットから下記式を使用して、酵素溶液中のペプチド複合体および対応する自然ペプチドについての半減期($T_{1/2}$)を計算した：

$$T_{1/2} = 1/k_{obs} \times \ln(2)$$

ここで k_{obs} は観測された分解についての見掛けの一次速度定数である。

H-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-OH(PTH(1-34)(ヒト)-OH)

ロイシンアミノペプチダーゼ中の加水分解反応速度論

前述したように、ロイシンアミノペプチダーゼ(25単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp

-Val-His-Asn-Phe-OH(約 2.4×10^{-5} M)の分解を研究した。前に記載したように、分解についての偽一次速度定数は 2.1×10^{-3} /分であると評価され、そして対応する半減期は330分であると計算された。

【0161】

カルボキシペプチダーゼA中の加水分解反応速度論

前述したように、カルボキシペプチダーゼA(1単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-OH(約 2.4×10^{-5} M)の分解を研究した。前に記載したように、分解についての偽一次速度定数は5.2/分であると評価され、そして対応する半減期は0.13分であると計算された。

H-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-(Lys)₆-OH(PTH(1-34)(ヒト)-Lys₆-OH)

ロイシンアミノペプチダーゼ中の加水分解反応速度論

前述したように、ロイシンアミノペプチダーゼ(25単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-(Lys)₆-OH(約 2.0×10^{-5} M)の分解を研究した。前に記載したように、分解についての偽一次速度定数は 1.2×10^{-3} /分であると評価され、そして対応する半減期は578分であると計算された。

【0162】

カルボキシペプチダーゼA中の加水分解反応速度論

前述したように、カルボキシペプチダーゼA(1単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-(Lys)₆-OH(約 2.0×10^{-5} M)の分解を研究した。前に記載したように、分解についての偽一次速度定数は 1.5×10^{-2} /分であると評価され、そして対応する半減期は47分であると計算された。

H-(Lys)₆-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-OH((Lys)₆-PTH(1-34)(ヒト)-OH)

ロイシンアミノペプチダーゼ中の加水分解反応速度論

前述したように、ロイシンアミノペプチダーゼ(25単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-(Lys)₆-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-OH(約 2.0×10^{-5} M)の分解を研究した。前に記載したように、分解についての偽一次速度定数は 3.5×10^{-3} /分であると評価され、そして対応する半減期は198分であると計算された。

H-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-OH(GLP-1(1-36)(ヒト)-OH)

ロイシンアミノペプチダーゼ中の加水分解反応速度論

前述したように、ロイシンアミノペプチダーゼ(25単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-OH(約 3.0×10^{-5} M)の分解を研究した。前に記載したように、分解についての偽一次速度定数は 3.1×10^{-2} /分であると評価され、そして対応する半減期は22分であると計算された。

【0163】

カルボキシペプチダーゼA中の加水分解反応速度論

前述したように、カルボキシペプチダーゼA(1単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-OH(約 3.0×10^{-5} M)の分解を研究した。前に記載したように、分解についての偽一次速度定数は 4.3×10^{-3} /分であると評価され、そして対応する半減期は148分であると計算された。

H-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala

a-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-(Lys)₆-OH(GLP-1-(7-36)
(ヒト)-(Lys)₆-OH)

ロイシニアミノペプチダーゼ中の加水分解反応速度論

前述したように、ロイシニアミノペプチダーゼ(25単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-(Lys)₆-OH(約 2.5×10^{-5} M)の分解を研究した。前に記載したように、分解についての偽一次速度定数は 1.3×10^{-2} /分であると評価され、そして対応する半減期は53分であると計算された。

【0164】

カルボキシペプチダーゼA中の加水分解反応速度論

前述したように、カルボキシペプチダーゼA(1単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-(Lys)₆-OH(約 2.5×10^{-5} M)の分解を研究した。前に記載したように、分解についての偽一次速度定数は 8×10^{-3} /分であると評価され、そして対応する半減期は87分であると計算された。

H-Gly-Gly-Thr-Tyr-Ser-Cys-His-Phe-Gly-Pro-Leu-Thr-Trp-Val-Cys-Lys-Pro-Gln-Gly-Gly-OH(EMP-1-OH)

ロイシニアミノペプチダーゼ中の加水分解反応速度論

前述したように、ロイシニアミノペプチダーゼ(25単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-Gly-Gly-Thr-Tyr-Ser-Cys-His-Phe-Gly-Pro-Leu-Thr-Trp-Val-Cys-Lys-Pro-Gln-Gly-Gly-OH(約 4.8×10^{-5} M)の分解を研究した。前に記載したように、分解についての偽一次速度定数は 1.5×10^{-3} /分であると評価され、そして対応する半減期は462分であると計算された。

【0165】

カルボキシペプチダーゼA中の加水分解反応速度論

前述したように、カルボキシペプチダーゼA(1単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-Gly-Gly-Thr-Tyr-Ser-Cys-His-Phe-Gly-Pro-Leu-Thr

-Trp-Val-Cys-Lys-Pro-Gln-Gly-Gly-OH(約 4.8×10^{-5} M)の分解を研究した。分解について50時間より長い半減期が評価された。

H-Gly-Gly-Thr-Tyr-Ser-Cys-His-Phe-Gly-Pro-Leu-Thr-Trp-Val-Cys-Lys-Pro-Gln-Gly-Gly-(Lys)₆-OH(EMP-1-(Lys)₆-OH)

ロイシンアミノペプチダーゼ中の加水分解反応速度論

前述したように、ロイシンアミノペプチダーゼ(25単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-Gly-Gly-Thr-Tyr-Ser-Cys-His-Phe-Gly-Pro-Leu-Thr-Trp-Val-Cys-Lys-Pro-Gln-Gly-Gly-(Lys)₆-OH(約 3.5×10^{-5} M)の分解を研究した。分解について100時間より長い半減期が評価された。

【0166】

カルボキシペプチダーゼA中の加水分解反応速度論

前述したように、カルボキシペプチダーゼA(1単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-Gly-Gly-Thr-Tyr-Ser-Cys-His-Phe-Gly-Pro-Leu-Thr-Trp-Val-Cys-Lys-Pro-Gln-Gly-Gly-(Lys)₆-OH(約 3.5×10^{-5} M)の分解を研究した。分解について20時間より長い半減期が評価された。

H-(Lys)₆-Gly-Gly-Thr-Tyr-Ser-Cys-His-Phe-Gly-Pro-Leu-Thr-Trp-Val-Cys-Lys-Pro-Gln-Gly-Gly-OH((Lys)₆-EMP-1-OH)

ロイシンアミノペプチダーゼ中の加水分解反応速度論

前述したように、ロイシンアミノペプチダーゼ(25単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-(Lys)₆-Gly-Gly-Thr-Tyr-Ser-Cys-His-Phe-Gly-Pro-Leu-Thr-Trp-Val-Cys-Lys-Pro-Gln-Gly-Gly-OH(約 3.5×10^{-5} M)の分解を研究した。分解について24時間より長い半減期が評価された。

H-(Lys)₆-Gly-Gly-Thr-Tyr-Ser-Cys-His-Phe-Gly-Pro-Leu-Thr-Trp-Val-Cys-Lys-Pro-Gln-Gly-Gly-(Lys)₆-OH((Lys)₆-EMP-1-(Lys)₆-OH)

ロイシンアミノペプチダーゼ中の加水分解反応速度論

前述したように、ロイシンアミノペプチダーゼ(25単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-(Lys)₆-Gly-Gly-Thr-Tyr-Ser-Cys-His-Phe-Gly-Pro-Leu-Thr-Trp-Val-Cys-Lys-Pro-Gln-Gly-Gly-(Lys)₆-OH(約 2.8×10^{-5} M)の分解を研究した。分解について100時間より長い半減期が評価された。

H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ (サブスタンスP)

ロイシンアミノペプチダーゼ中の加水分解反応速度論

前述したように、ロイシンアミノペプチダーゼ(25単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂(約 7.4×10^{-5} M)の分解を研究した。前に記載したように、分解についての偽一次速度定数は 4.5×10^{-2} /分であると評価され、そして対応する半減期は16分であると計算された。

【0167】

カルボキシペプチダーゼA中の加水分解反応速度論

前述したように、カルボキシペプチダーゼA(1単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂(約 7.4×10^{-5} M)の分解を研究した。前に記載したように、分解についての偽一次速度定数は 2.0×10^{-2} /分であると評価され、そして対応する半減期は35分であると計算された。

H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-(Lys)₆-NH₂ (サブスタンスP-(Lys)₆-NH₂)

ロイシンアミノペプチダーゼ中の加水分解反応速度論

前述したように、ロイシンアミノペプチダーゼ(25単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-(Lys)₆-NH₂(約 4.7×10^{-5} M)の分解を研究した。前に記載したように、分解についての偽一次速度定数は 1.1×10^{-2} /分であると評価され、そして対応する半減期は66分であると計算された。

【0168】

カルボキシペプチダーゼA中の加水分解反応速度論

前述したように、カルボキシペプチダーゼA(1単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-(Lys)₆-NH₂(約 4.7×10^{-5} M)の分解を研究した。前に記載したように、分解についての偽一次速度定数は 5.5×10^{-3} /分であると評価され、そして対応する半減期は126分であると計算された。

H-(Lys)₆-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ ((Lys)₆-サブスタンス P-NH₂)

ロイシンアミノペプチダーゼ中の加水分解反応速度論

前述したように、ロイシンアミノペプチダーゼ(25単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-(Lys)₆-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂(約 4.7×10^{-5} M)の分解を研究した。前に記載したように、分解についての偽一次速度定数は 2×10^{-3} /分であると評価され、そして対応する半減期は347分であると計算された。

H-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu-OH(DSIP)

ロイシンアミノペプチダーゼ中の加水分解反応速度論

前述したように、ロイシンアミノペプチダーゼ(25単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu-OH(約 10^{-5} M)の分解を研究した。分解について20分より短い半減期が計算された。

H-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu-(Lys-Glu)₃-OH(DSIP-(Lys-Glu)₃-OH)

ロイシンアミノペプチダーゼ中の加水分解反応速度論

前述したように、ロイシンアミノペプチダーゼ(25単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu-(Lys-Glu)₃-OH(約 10^{-5} M)の分解を研究した。前に記載したように、分解についての偽一次速度定数を測定し、そして対応する半減期は145分であると計算された。

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH(Leu-エンケファリン)

ロイシンアミノペプチダーゼ中の加水分解反応速度論

前述したように、ロイシンアミノペプチダーゼ(25単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH(約 1.8×10^{-4} M)の分解を研究した。前に記載したように、分解についての偽一次速度定数は 6.8×10^{-1} /分であると評価され、そして対応する半減期は1.0分であると計算された。

【0169】

カルボキシペプチダーゼA中の加水分解反応速度論

前述したように、カルボキシペプチダーゼA(1単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH(約 1.8×10^{-4} M)の分解を研

究した。前に記載したように、分解についての偽一次速度定数は 9.8×10^{-1} /分であると評価され、そして対応する半減期は0.7分であると計算された。

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Lys)₆-OH(Leu-エンケファリン-(Lys)₆-OH)

ロイシニアミノペプチダーゼ中の加水分解反応速度論

前述したように、ロイシニアミノペプチダーゼ(25単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Lys)₆-OH(約 7.5×10^{-5} M)の分解を研究した。前に記載したように、分解についての偽一次速度定数は 9.7×10^{-3} /分であると評価され、そして対応する半減期は72分であると計算された。

【0170】

カルボキシペプチダーゼA中の加水分解反応速度論

前述したように、カルボキシペプチダーゼA(1単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Lys)₆-OH(約 7.5×10^{-5} M)の分解を研究した。前に記載したように、分解についての偽一次速度定数は 7×10^{-4} /分であると評価され、そして対応する半減期は990分であると計算された。

H-(Lys)₆-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH((Lys)₆-Leu-エンケファリン-OH)

ロイシニアミノペプチダーゼ中の加水分解反応速度論

前述したように、ロイシニアミノペプチダーゼ(25単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-(Lys)₆-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH(約 7.5×10^{-5} M)の分解を研究した。前に記載したように、分解についての偽一次速度定数は 2.6×10^{-2} /分であると評価され、そして対応する半減期は27分であると計算された。

H-(Lys)₆-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Lys)₆-OH((Lys)₆-Leu-エンケファリン-(Lys)₆-OH)

ロイシニアミノペプチダーゼ中の加水分解反応速度論

前述したように、ロイシニアミノペプチダーゼ(25単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-(Lys)₆-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Lys)₆-OH(約 4.8×10^{-5} M)の分解を研究した。分解について100時間より長い半減期が評価された。

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Lys)₁₀-OH(Leu-エンケファリン-(Lys)₁₀-OH)

ロイシニアミノペプチダーゼ中の加水分解反応速度論

前述したように、ロイシニアミノペプチダーゼ(25単位/ml)を含有する50mMの

リン酸塩緩衝液pH7.4中のH-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Lys)₁₀-OH(約 5.4×10^{-5} M)の分解を研究した。分解について100時間より長い半減期が評価された。

【0171】

カルボキシペプチダーゼA中の加水分解反応速度論

前述したように、カルボキシペプチダーゼA(1単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Lys)₁₀-OH(約 5.4×10^{-5} M)の分解を研究した。前に記載したように、分解についての偽一次速度定数は 3×10^{-4} /分であると評価され、そして対応する半減期は2310分であると計算された。

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Orn)₆-OH(Leu-エンケファリン-(Orn)₆-OH)

ロイシンアミノペプチダーゼ中の加水分解反応速度論

前述したように、ロイシンアミノペプチダーゼ(25単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Orn)₆-OH(約 5.7×10^{-5} M)の分解を研究した。前に記載したように、分解についての偽一次速度定数は 6.4×10^{-3} /分であると評価され、そして対応する半減期は108分であると計算された。

【0172】

カルボキシペプチダーゼA中の加水分解反応速度論

前述したように、カルボキシペプチダーゼA(1単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Orn)₆-OH(約 5.7×10^{-5} M)の分解を研究した。分解について100時間より長い半減期が評価された。

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Dbu)₆-OH(Leu-エンケファリン-(Dbu)₆-OH)

ロイシンアミノペプチダーゼ中の加水分解反応速度論

前述したように、ロイシンアミノペプチダーゼ(25単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Dbu)₆-OH(約 6.0×10^{-5} M)の分解を研究した。前に記載したように、分解についての偽一次速度定数は 2.5×10^{-2} /分であると評価され、そして対応する半減期は28分であると計算された。

【0173】

カルボキシペプチダーゼA中の加水分解反応速度論

前述したように、カルボキシペプチダーゼA(1単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Dbu)₆-OH(約 6.0×10^{-5} M)の分

解を研究した。前に記載したように、分解についての偽一次速度定数は 5×10^{-3} /分であると評価され、そして対応する半減期は1386分であると計算された。

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Dpr)₆-OH(Leu-エンケファリン-(Dpr)₆-OH)

ロイシンアミノペプチダーゼ中の加水分解反応速度論

前述したように、ロイシンアミノペプチダーゼ(25単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Dpr)₆-OH(約 6.3×10^{-5} M)の分解を研究した。前に記載したように、分解についての偽一次速度定数は 1.7×10^{-1} /分であると評価され、そして対応する半減期は4.2分であると計算された。

【0174】

カルボキシペプチダーゼA中の加水分解反応速度論

前述したように、カルボキシペプチダーゼA(1単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(Dpr)₆-OH(約 6.3×10^{-5} M)の分解を研究した。前に記載したように、分解についての偽一次速度定数は 2.4×10^{-2} /分であると評価され、そして対応する半減期は29分であると計算された。

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys-(Glu)₄-Lys-OH(Leu-エンケファリン-Lys-(Glu)₄-Lys-OH)

ロイシンアミノペプチダーゼ中の加水分解反応速度論

前述したように、ロイシンアミノペプチダーゼ(25単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys-(Glu)₄-Lys-OH(約 7.5×10^{-5} M)の分解を研究した。前に記載したように、分解についての偽一次速度定数は 6.5×10^{-2} /分であると評価され、そして対応する半減期は11分であると計算された。

【0175】

カルボキシペプチダーゼA中の加水分解反応速度論

前述したように、カルボキシペプチダーゼA(1単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys-(Glu)₄-Lys-OH(約 7.5×10^{-5} M)の分解を研究した。前に記載したように、分解についての偽一次速度定数は 6×10^{-4} /分であると評価され、そして対応する半減期は1155分であると計算された。

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys-(Glu)₃-(Lys)₂-OH(Leu-エンケファリン-Lys-(Glu)₃-(Lys)₂-OH)

ロイシニアミノペプチダーゼ中の加水分解反応速度論

前述したように、ロイシニアミノペプチダーゼ(25単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys-(Glu)₃-(Lys)₂-OH(約 7.5×10^{-5} M)の分解を研究した。前に記載したように、分解についての偽一次速度定数は 1.2×10^{-1} /分であると評価され、そして対応する半減期は5.7分であると計算された。

【0176】

カルボキシペプチダーゼA中の加水分解反応速度論

前述したように、カルボキシペプチダーゼA(1単位/ml)を含有する50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4中のH-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys-(Glu)₃-(Lys)₂-OH(約 7.5×10^{-5} M)の分解を研究した。前に記載したように、分解についての偽一次速度定数は 8×10^{-4} /分であると評価され、そして対応する半減期は866分であると計算された。

【0177】

エンケファリンアナログを使用する研究

マウスにおけるLeu-エンケファリン-OHおよびLeu-エンケファリン-(Lys)₆-OHのバイオアベイラビリティ

50mg/kg体重のLeu-エンケファリン-(Lys)₆-OHを体重20~25gの雄マウスに経静脈または経口投与した。化合物を等張NaCl溶液中に溶解した。50mg/kgのLeu-エンケファリン-(Lys)₆-OHで経口処置したマウスを、投与後0、15、30、60、90、240、480、960および1380分に断頭により採血した。50mg/kgのLeu-エンケファリン-(Lys)₆-OHで経静脈処置したマウスを、投与後5、15、30、60、180、240、370、720、1080および1440分に断頭により採血した。50mg/kgの自然Leu-エンケファリン-OHで経口または経静脈処置したマウスを、投与後30分の断頭により採血した。血液試料を直ちに遠心し(3000g、4℃)、血清を単離し、活性測定のために使用した。

【0178】

マウスからの輸精管モデルを使用するバイオアッセイにより、血清中のLeu-エンケファリン-OHまたはLeu-エンケファリン-(Lys)₆-OHの濃度を測定した。TakemoriおよびPorthogese、1984、Eur.J.Pharmacol. 104:101-104に本質的に記載されているように、実験を実施した。簡単に述べると、体重20~30gの雄マウス(M♂11legaard育種、DK)から輸精管を単離し、10mlの浴中で2つの電極間で1gの静止張力において懸垂した。組織を36~37℃に維持したクレブス重炭酸塩溶液(生理緩衝液)の中に入れ、95%O₂および5%CO₂で泡立てて通入した。組織を電氣的に刺激し(70V、1msの期間;0.1Hz)、収縮をチャートレコーダーで等長的に記録した。組織を少なくとも20分間平衡化した後、薬剤を浴に添加し、最大作用を測定した。データを下記の方程式に代入した：阻害% = $\frac{MAX \times (1 - [阻害]^n)}{[阻害]^n + IC_{50}^n}$ + 基線、ここでMAXは最大筋収縮であり、[阻害]はインヒビターの濃度であり、nは曲線のヒル勾配であり、そして基線は化合物に対して不感受性の筋収縮である。こうして、計算した濃度は輸精管バイオアッセイ調製物中の阻害活性の反映であり、血清中のLeu-エンケファリン-OHまたはLeu-エンケファリン-(Lys)₆-OHの正確な濃度ではない。

【0179】

Leu-エンケファリン-OHおよびLeu-エンケファリン-(Lys)₆-OHについての値は、少なくとも5回の実験の平均値±S.E.M.である。血清中のLeu-エンケファリン-(Lys)₆-OH濃度を測定するアッセイにおいて、100μlの血清を組織浴に添加し、応答の阻害%を測定した。結果を表2に示す。

表2：マウスにおけるLeu-エンケファリン-(Lys)₆-OHの経口または静脈投与後の血清中の機能的活性(n=6~8血清試料/時点：平均±S.E.M.)。

【0180】

経口投与		静脈投与	
時間	活性	時間	活性
分		分	
Leu-エンケファリン-(Lys) ₆ -OH(nM)		Leu-エンケファリン-(Lys) ₆ -OH(nM)	
0	0	5	15900±2400
15	<検出限界	15	8500±1200

30	3000±800	30	6000±950
60	6000±1300	60	1600±340
90	10900±3800	180	440±110
240	10700±230	240	2500±320
480	5000±580	370	31200±8620
960	2800±780	720	<検出限界
1380	<検出限界	1080	<検出限界
N/A	N/A	1440	<検出限界

N/A：適用不可能

50mg/kg体重のLeu-エンケファリン-(Lys)₆-OHの静脈注射後、5分後、血清中で急速な活性増加が既に観測された。次いで、活性は次の30分以内に減少したが、240分(4時間)と720分(12時間)との間において、活性は第2ピークレベルに到達した。第2ピークは静脈注射後の薬剤の腸肝循環に多分関係した。Leu-エンケファリン-(Lys)₆-OHの静脈投与後12、18および24時間において、血漿中の活性は検出限界以下であった。Leu-エンケファリン-(Lys)₆-OHの経口投与後、血清中の活性は90～240分(1.5～4時間)に最大に到達し、8および16時間後に検出可能であったが、23時間後には検出不可能であった。Leu-エンケファリン-(Lys)₆-OHで経口または経静脈処置した動物からの血清試料中で、高い活性は30分に観測されたが、自然Leu-エンケファリン-OHの経口または静脈投与後30分において、活性は観測されなかった。

【0181】

これらの結果から示唆されるように、経口投与後Leu-エンケファリン-(Lys)₆-OHは吸収されたが、Leu-エンケファリン-OHは吸収されず、そしてマウスにおいて血清中の排除速度は自然Leu-エンケファリンに関して実質的に減少する。

37℃におけるマウス血漿中のLeu-エンケファリン-OHおよびLeu-エンケファリン-(Lys)₆-OHの安定性

前述した輸精管バイオアッセイモデルにおいて、37℃におけるマウス血漿中のLeu-エンケファリン-OH、Leu-エンケファリン-(Lys)₆-OH、Leu-エンケファリン-(Glu₂-Lys-Glu₃)-OH、Leu-エンケファリン-(Lys-Glu₄-Lys)-OH、Leu-エンケファ

リン-(ORN)₆-OH、Leu-エンケファリン-(DBU)₆-OH、Leu-エンケファリン-(DPR)₆-OH、およびLeu-エンケファリン-(Lys)₁₀-OHの安定性を検査した。血漿試料を添加する前に、阻害活性を各被験物質の濃度として表わすために各調製物において標準投与量応答曲線を描いた。こうして、計算した濃度は輸精管バイオアッセイ調製物中の阻害活性の反映である。投与量／応答のデータを下記の方程式に代入した：

$$\text{応答} = \text{初期値} \times (1 - (\text{濃度} / \text{EC50} + \text{濃度})) + \text{バックグラウンド}$$

ここで初期値＝被験物質添加前の初期の電氣的に誘発された収縮力；濃度＝被験物質の濃度；EC50＝電氣的に誘発された収縮の最大阻害の1/2を生成する被験物質の濃度；バックグラウンド＝最大弛緩間の収縮力。

【0182】

すべてのエンケファリンアナログをクレブス緩衝液中に1mMの濃度で溶解した。37℃において、66 μ lの各被験物質溶液(66nmolのエンケファリンアナログ)を600 μ lの血漿とインキュベートした。異なる時点(2～120分)において、機能的活性の分析のために10 μ lの試料を抽出した。輸精管バイオアッセイにおいて電氣的に誘発された収縮の同一阻害を誘発した被験物質の濃度として、血漿中の各被験物質の機能的活性を表した。下記の方程式に時間／濃度のデータを代入することによって、T1/2を計算した：

【0183】

【数1】

$$\text{濃度}(t) = \text{濃度}(0) \cdot e^{(-\ln 2 / T_{1/2}) \cdot t}$$

【0184】

ここで濃度(0)＝t=0における濃度。結果を表3に示す。

表3：種々のエンケファリンアナログについてのEC50およびT_{1/2}値(n=3～4/被験物質：平均)

化合物	EC50値(nM)	T _{1/2} 分
Leu-エンケファリン-OH	65	6.3
Leu-エンケファリン-(Lys) ₆ -OH	160	18.7
Leu-エンケファリン-(Glu) ₆ -OH	140	ND
Leu-エンケファリン-(Lys-Glu) ₃ -OH	350	ND
Leu-エンケファリン-(Lys ₂ -Glu ₃ -Lys)-OH	680	ND
Leu-エンケファリン-(Lys-Glu ₄ -Lys)-OH	357	84.5
Leu-エンケファリン-(orn) ₆ -OH	>20000	ND
Leu-エンケファリン-(Dbu) ₆ -OH	20000	ND
Leu-エンケファリン-(Dpr) ₆ -OH	200	19.8
Leu-エンケファリン-(Lys) ₁₀ -OH	2500	ND

ND: 測定せず。

【0185】

これらのデータから示唆されるように、Leu-エンケファリン-OHの修飾はEC50値を増加させかつ37℃におけるマウス血漿中の安定性を増加させた。

Leu-エンケファリン-OHアナログの μ -レセプター結合

Christensen, 1993, Pharmacol.Toxicol. 73:344-345に記載されているように、³H](D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly-o¹⁵)エンケファリン(DAMGO)(1nM)を使用して、 μ オピオイドレセプターに対するアフィニティーを測定した。簡単に述べると、屠殺後数分以内にウシ脳を氷上に配置した。尾状核を切り取り、20体積の0.32Mのスクロース中で均質化した。ホモジネートを2000gにおいて10分間遠心した。ペレットを10体積の50mMのTris-HCl緩衝液、pH7.4の中に再懸濁させ、使用するまで-20℃において貯蔵した。シナプス膜画分を1nMの³H]DAMGOと種々の濃度の被験リガンドの存在下にインキュベートした。1 μ Mのナロキソンを使用して、非特異的に結合した³H]-DAMGOを確立した。36℃において15分間インキュベートした後、ワットマン(Whatman)GF/Cフィルターを通して試料を濾過し、緩衝液で洗浄した。慣用技術により、放射能を測定した。

【0186】

下記表4に示すように、すべての化合物はこの結合アッセイにおいて活性であ

り、Leu-エンケファリン-OHの修飾はレセプターのアフィニティーに影響を与えることが示される。

表4: ^3H -DAMGO結合として測定した μ オピオイドレセプターに対するLeu-エンケファリン-OHアナログのアフィニティー(IC_{50} (平均 \pm SD))。

【0187】

化合物	IC_{50} 値(nM)	IC_{50} 値(nM)
	0時間	18時間
Leu-エンケファリン-OH	97 \pm 9	80
Leu-エンケファリン-(Lys) ₆ -OH	17 \pm 7	32
Leu-エンケファリン-(Glu) ₆ -OH	10,000	5,000
Leu-エンケファリン-(Lys-Glu) ₃ -OH	450 \pm 130	900
ナロキソン	9.2 \pm 1.0	7

他の被験物質に関するLeu-エンケファリン-(Glu)₆-OHの低いアフィニティーは、この化合物の非常に低い溶解度のためである。こうして、Leu-エンケファリン-(Glu)₆-OHの IC_{50} 値は、その化合物がいっそう可溶性である溶媒中で試験する場合、より低いことがある。

【0188】

マウスにおけるEMP-1-K₆を使用するin vivo実験

EMP-1およびEMP-1-K₆を使用する経口的(p.o.)処置の生物学的効能を検査するために、等モル量のp.o.投与量(956nmol)のEMP-1(2mg)およびEMP-1-K₆(2.56mg)の血液学的応答を雄マウス(n=8/グループ)において検査した。血液学的応答の時間経過を検査するために、第0日、第2日、および第4日に後眼窩叢から10 μ lの静脈血試料を収集した。体重(BW)およびヘモグロビンの血漿濃度(P-Hgb)、ヘマトクリット値(Hct)、赤血球計数(RBC)、および平均細胞ヘモグロビン濃度(MCHC)を、EMP-1またはEMP-1-K₆投与前(第0日)、および投与後第2日および第4日に測定した。結果を表5に示す。

表5: 956nmolのEMP-1またはEMP-1-K₆のp.o.投与後4日の体重および血液学的パラメーターの変化。相対変化は括弧内に表されている(平均 \pm SEM)。

【0189】

	EMP-1 p.o.	EMP-1-K ₆ p.o.
BW(g)	3.4±0.2 (16±1%)	3.4±0.3 (15±2%)
P-Hgb(mM)	15.±0.5 (+8±1%)	+2.4±0.3* (+15±2%*)
ヘマトクリット(%)	0.3±0.8 (0.8±1.8%)	4.5±0.9* (12.3±2.3%*)
RCB	0.6±0.2 (9±3%)	1.0±0.1* (17±2%*)
(10 ¹² 細胞/l)		
MCHC(mM)	2.9±1.5 (4±2%)	0.2±1.5 (0±2%)

* : p<0.05/EMP-1 p.o.

これらのデータが示すように、2.56mgのEMP-1-K₆のp.o.投与はP-Hgb、Hct、およびRBCを等モル量のEMP-1のp.o.投与よりも有意に大きく増加する。化合物のいずれも成長またはMCHCに影響を与えない。これらの結果が示唆するように、EMP-1-K₆はp.o.投与後に吸収され、そしてマウスにおける赤血球形成の急速な刺激を誘発する。

【0190】

副甲状腺ホルモン(PTH)アナログを使用する研究

一般的手順

骨芽細胞退縮アッセイ

発表されたプロトコールに従い1日齢マウスの頭蓋冠から調製した骨芽細胞を使用して、退縮アッセイを実施した(Miller 他、1976、Science 192:1340-1343)。簡単に述べると、0.1%のウシ血清アルブミン(PBS)を含有するリン酸塩緩衝液中のI型コラーゲンの50 μ g/mlで被覆した96ウェルの組織培養プレートの中に、無血清最少必須培地- α (α MEM)中の骨芽細胞を3000細胞/cm²の密度において播種した。プレート後1日に、PTHを10nMの最終濃度に添加し、インキュベーションを1時間実施した。次いで細胞を固定し、トルイジンブルーで染色し、退縮した細胞を視的検査により計数した。

【0191】

細胞の10~12%のみが退縮するブランクに比較して、PTHそれ自体細胞の約64%を退縮させることができる。

H-PTH(1-34)についての酵素イムノアッセイ(EIA)

これは標準的EIAアッセイである(Peninsula Laboratories, IncからのEIAS(h)-6101)。ビオチニル化ペプチドおよびペプチドはPTH(1-34)-抗体に対する結合について競合する。ストレプトアビジン複合体セイヨウワサビペルオキシダーゼ(SA-HRP)を、一次抗体/ビオチニル化ペプチド複合体に結合させる。3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン二塩酸塩(TMB)を結合HRPと反応させる。色強度を使用して定量する。

【0192】

アッセイの特異性: hPTH(1-34)=100%; hPTH(1-38)=100%; hPTH(1-44)=0%; hPTH(39-68)=0%; hPTH(1-84)=0%; ratPTH(1-34)=0%。

結果を表6に示す。骨芽細胞退縮アッセイにおいて、hPTH(1-34)は自然、H-副甲状腺ホルモンの活性のほぼ89%を保持する。H-hPTH(1-34)-K₆-OHおよびH-K₆-PTH(1-34)-OHは、母化合物hPTH(1-34)の活性の、それぞれ、55および49%を示す。EIAにおいて使用したhPTH(1-34)に対する抗体は2つの修飾をよく認識する。

【0193】

表6

化合物/アッセイ	退縮アッセイ	EIA
	退縮細胞%	相対回復%
副甲状腺ホルモン	63.7	—
hPTH(1-34)	58.2	90.8
H-hPTH(1-34)-K ₆ -OH	37.4	61.8
H-K ₆ -PTH(1-34)-OH	34.7	79.1
ブランク	11.8	—

サブスタンス P-NH₂ および (Lys)₆-サブスタンス P-NH₂ の機能的活性

モルモット回腸を使用して、サブスタンス P-NH₂ および (Lys)₆-サブスタンス P-NH₂ の機能的活性を特性決定した。回腸を電氣的に刺激しない以外、Kirstiansen

他、1992、Br. J. Pharmacol. 58:1150)に本質的に記載されているように、実験を実施した。化合物の適用後、誘発された収縮を測定した。投与量／応答データを下記の方程式に代入した：

$$\text{応答} = \text{初期値} \times \text{濃度} / (\text{EC}_{50} + \text{濃度})$$

ここで初期値＝被験物質添加前の初期の電氣的に誘発された収縮力；濃度＝被験物質の濃度；EC₅₀＝電氣的に誘発された収縮の最大阻害の1/2を生成する被験物質の濃度。

【0194】

サブスタンス P-NH₂ (EC₅₀＝40nM)および(Lys)₆-サブスタンス P-NH₂ (EC₅₀＝5nM)の双方はモルモット回腸においてアゴニストとして作用した。

本明細書に記載しかつ特許請求された本発明は、本明細書に開示された特定の態様により範囲を限定されない。なぜなら、これらの態様は本発明のいくつかの面を例示することを意図しているからである。任意の同等の態様は本発明の範囲内に入ることを意図する。事実、本明細書において示しかつ記載したものに加えて、本発明の種々の変更は上記説明から当業者にとって明らかとなるであろう。このような変更は、また、本発明の範囲内に入る。

【0195】

種々の参考文献は本明細書において引用され、それらの開示は引用することによって本明細書の一部とされる。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
PCT/DK 99/00118

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C07K1/107 A61K47/48		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ¹	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 98 11126 A (LARSEN BJARNE DUE ; HOLM ARNE (DK)) 19 March 1998 (1998-03-19) cited in the application the whole document ---	1-51
P, X	WO 98 22577 A (MASUCCI MARIA GRAZIA) 28 May 1998 (1998-05-28) cited in the application page 3, line 17 - line 21 page 14, line 11 - page 17, line 5; claims ---	1-3, 30-32, 34, 35
A	WO 95 13085 A (DEMETER BIOTECH LTD) 18 May 1995 (1995-05-18) page 5, paragraph 2 - paragraph 4; claims; examples 1, 7 --- -/-	1, 32, 34, 36
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
¹ Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "S" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 August 1999		Date of mailing of the international search report 30/08/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5318 Patentstr. 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Ts. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Fuhr, C

Form PCT/ISA/210 (second sheet) July 1992

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/DK 99/00118

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 91 19735 A (SIMON REYNA J ;BARTLETT PAUL A (US); SANTI DANIEL V (US)) 26 December 1991 (1991-12-26) page 9, line 16 - page 12, line 10; claims	1,32,34, 36
A	WO 98 03192 A (INTRABIOTICS PHARMACEUTICALS I) 29 January 1998 (1998-01-29) page 3, line 6 - line 18 page 11, line 22 - line 37; claims	1,32,34, 36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DK 99/00118

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 37-50
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although claims 37-50 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependant claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims: it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internatio. Application No

PCT/DK 99/00118

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9811126 A	19-03-1998	AU 4199497 A EP 0932614 A	02-04-1998 04-08-1999
WO 9822577 A	28-05-1998	AU 5065198 A	10-06-1998
WO 9513085 A	18-05-1995	AU 1086595 A US 5561107 A US 5717064 A US 5773413 A	29-05-1995 01-10-1996 10-02-1998 30-06-1998
WO 9119735 A	26-12-1991	AU 683184 B AU 3296495 A CA 2085118 A EP 0535155 A IE 66205 B JP 6504758 T PT 97992 A,B US 5811387 A	30-10-1997 07-03-1996 15-12-1991 07-04-1993 13-12-1995 02-06-1994 30-04-1992 22-09-1998
WO 9803192 A	29-01-1998	US 5916872 A AU 3963097 A	29-06-1999 10-02-1998

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	識別記号	F I	備考(参考)
A 6 1 P	5/24	A 6 1 P	9/12
	9/12		13/02
	13/02		19/10
	19/10		25/04
	25/04		25/18
	25/18		25/20
	25/20		25/24
	25/24		25/28
	25/28		29/00
	29/00		31/18
	31/18		35/00
	35/00	C 0 7 K	5/00
C 0 7 K	5/00		7/00
	7/00		14/435
	14/435		14/60
	14/60		14/635
	14/635	C 1 2 P	21/02
C 1 2 N	15/09	A 6 1 K	37/02
C 1 2 P	21/02	C 1 2 N	15/00
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K E, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), E A(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T J, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, G H, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, J P, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, M W, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, Z W		C
Fターム(参考)	4B024 AA01 BA01 BA03 BA05 CA01 GA11 HA01		Z N A A
	4B064 AG02 AG13 AG15 CA19 CC24		
	4C076 AA36 BB01 EE41 EE59 FF70		
	4C084 AA02 BA24 DA13 DA14 DB01 DB14 DB32 MA52 NA14 ZA052 ZA082 ZA122 ZA152 ZA162 ZA422 ZA512 ZA812 ZA972 ZB262 ZC032 ZC352		
	4H045 AA10 BA10 BA41 CA40 DA01 DA31 DA33 DA45 EA20 EA30		